

Aus dem Bereich Physiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Analyse kalziumabhängiger Exozytose von
Large Dense Core Vesicles in Chromaffinzellen bei
Snapin defizienten Mäusen**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin***

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2015

vorgelegt von
Michael Unzicker
geb. am 30.07.1979 in Lahn-Wetzlar

I. Tag der Promotion:

II. Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

III. Berichterstatter/in:

Anschrift: Universitätsklinikum des Saarlandes
Institut für Physiologie
Kirrberger Straße 100
Gebäude 48
66421 Homburg/Saar

Inhalt

I SUMMARY	VI
II ABKÜRZUNGEN	VIII
III ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
IV TABELLENVERZEICHNIS	XIII
1. Einleitung	1
1.1. Neurone, Synapsen und Neurotransmission	1
1.2. Exozytose	2
1.3. Der synaptische Vesikelzyklus	3
1.4. Schlüsselschritte der Exozytose und das Poolmodell	5
1.5. Chromaffinzellen als Modell für Neurosekretion	8
1.6. Molekularer Mechanismus der Exozytose und beteiligte Strukturen (Proteine)	10
1.6.1. SNARE-Proteine	10
1.6.2. SM-Proteine	12
1.6.3. CAPS	14
1.6.4. Synaptotagmin	14
1.6.5. Zusammenspiel der Proteine	15
1.6.5. Snapin	15
1.7. Ziel dieser Arbeit	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1. Medien und Lösungen für Zellkultur und Elektrophysiologie	19
2.2. Methoden	21
2.2.1. <i>Knockout</i> -Mäuse	21
2.2.1.1. Snapin- <i>Knockout</i> -Linie	21
2.2.1.2. Snapin- <i>Rescue</i>	22
2.2.2. Zellkulturen	24
2.2.2.1. Präparation und Kultivierung isolierter Chromaffinzellen der Maus	24

2.2.2.2. Genotypisierung	25
2.2.2.2.1. Präparation der genomischen DNA	25
2.2.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion	26
2.2.2.2.3. Gel-Elektrophorese	27
2.2.3. Elektrophysiologie	28
2.2.3.1. <i>Patch clamp</i> -Technik	28
2.2.3.2. <i>Patch clamp</i> -Messplatz	29
2.2.3.3. Herstellung der <i>Patch</i> pipetten	30
2.2.3.4. Membrankapazitätsmessungen	30
2.2.3.5. Intrazelluläre Kalziumkontrolle	31
2.2.3.5.1. Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration	31
2.2.3.5.2. Kalzium-Photolyse	34
2.2.3.6. Amperometrie	36
2.2.3.6.1. Herstellung von Karbonfaser Elektroden	37
2.2.3.6.2. Amperometrie-Messung	38
2.2.3.7. Kapazitätsmessung bei photolyseinduzierter Kalziumfreisetzung in Kombination mit Amperometrie	40
2.2.3.8. Kalziumrampe	41
2.2.3.9. Datenanalyse	42
3. Ergebnisse	43
3.1. Generelle Beschreibung des experimentellen Modells	43
3.2. Intrazelluläre Kalziumkontrolle	45
3.3. Kapazitätsmessungen	46
3.4. Snapin- <i>Rescue</i> -Experiment	49
3.5. Amperometrie	50
4. Diskussion	53
4.1. Funktionelle Untersuchungen	53
4.2. Molekularer Mechanismus von Snapin	54
4.2.1. Biochemie am Snapin- <i>Knockout</i>	54
4.2.2. Morphologische Untersuchungen am Snapin- <i>Knockout</i>	58
4.3. Zusammenfassende Einordnung zur vorgeschlagenen Rolle von Snapin	59
4.4. Ausblick	60

5. Zusammenfassung	63
6. Literaturverzeichnis	64
7. Danksagung	73
8. Publikation	74

Summary

Neurotransmitter release results from calcium dependent exocytosis of transmitter filled vesicles. Knowledge about the participating molecular structures and mechanisms helps us to understand these complex and highly regulated processes, which, when disturbed, can lead to severe illness.

Snapin is a recently discovered protein that can be detected in neurons and neuroendocrine cells, which binds to SNAP-25, a protein of the exocytotic machinery. Preliminary biochemical and functional investigations suggest a modulatory role for snapin without providing molecular mechanism of action.

To further characterize the functional role of snapin in neurosecretion, a snapin knockout mouse was created. Experiments on cells from this mouse line provide the basis of my functional analyses. Genomic depletion of the snapin gene in mice results in a dramatic phenotype in which mice die shortly after birth. For this reason embryonic adrenal chromaffin cells were used for these investigations. In experiments, flash photolysis of caged calcium was used to generate rapid, well-controlled changes in intracellular calcium, which served as a trigger to study calcium-dependent neurosecretion. A reduction of 45 % in rapid catecholamine exocytosis was observed. Since vesicles are present in different maturation stages in chromaffin cells, the observation that only the fusion-competent pool is affected makes it possible to draw the conclusion that the effect of snapin is in either the *priming* or the *docking* step. Furthermore unchanged amperometric detection of secreted catecholamines can exclude a filling defect of the vesicles. Reintroduction of snapin by transfecting with the snapin wildtype gene reversed the functional defect in cultured cells.

In addition to that my colleagues could exclude a direct calcium dependent effect in experiments with slowly increasing intracellular calcium concentrations. In electron microscopic images, no morphological evidence for a *docking* defect was proven. In biochemical assays it was shown that loss of snapin led to a decreased association of the SNARE-complex to Synaptotagmin, the calcium sensor and trigger of exocytosis. From a molecular, mechanical perspective, this leads to a destabilisation of the forward reaction for vesicles entering the fusion competent pool with a consecutive reduction in the exocytotic capacity.

Altogether, the results indicate that snapin stabilizes the SNAP-25/SNARE-complex and enhances its association to synaptotagmin during the priming process that results in an increase in vesicles in the fusion-competent pool.

Abkürzungen

cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläre Kalziumkonzentration
BAPTA	<i>1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
C ₂	<i>Protein Kinase C conserved Domain 2</i>
CAPS	<i>Calcium dependent activator protein for secretion</i>
cm ²	Quadratzentimeter
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DP	<i>Depot pool</i>
E18	18. embryonaler Tag
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPSC	<i>Excitatory postsynaptic current</i> , exzitatorischer postsynaptischer Strom
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
F	(fura-) Fluoreszenzsignal
FDU-2	<i>Fluorescence Detection Unit</i>
fF	Femtofarad
GABA	γ-Aminobuttersäure
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSV-1	Herpes Simplex Virus-1
Hz	Hertz
I _{AMP}	Amperometrisch gemessener Strom
IgG	Immunglobulin G
K _D	Dissoziationskonstante
K _{eff}	Effektivkonstante
kDa	Kilodalton

kHz	Kilohertz
LDCV	Large dense core vesicles
MHD	Munc-Homologie-Domäne
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mOsm	Milliosmolar
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
nM	Nanomolar
n	Stichprobengröße
nm	Nanometer
NP-EGTA	o-Nitrophenyl EGTA
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
pA	Pikoampere
pF	Pikofarad
PH	<i>Pleckstrin</i> Homologie-Domäne
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PGKneo	Phosphoglycerat-Kinase (PGK) mit Neomycin Resistenzgen am PGK-promoter
PSD	Postsynaptische Verdichtung
R	Emissionsintensität (Verhältnis F1/F2)
R _{max}	Maximale Emissionsintensität
R _{min}	Minmale Emissionsintensität
RNA	Ribonukleinsäure
RRP	<i>Readily releasable pool</i>
S50D	Serin-zu-Aspartat-Mutation an Stelle „50“
S.E.M.	<i>Standard Error of the Mean</i>

SCGN	<i>Superior cervical ganglion neurons</i>
SCV	<i>Small clear vesicles</i>
SFV	<i>Semliki Forest Virus</i>
SNAP	<i>Soluble NSF attachment protein</i>
SNAP-25	<i>Synaptosome-associated protein of relative molecular mass 25 kDa</i>
SNARE	<i>Soluble NSF attachment protein receptor</i>
SRP	<i>Slowly releasable pool</i>
Syt	Synaptotagmin
TAE-Puffer	Tris Azetat EDTA Puffer
TIRFM	Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie
UPP	<i>Unprimed pool</i> , ungereifter Pool
VAMP	<i>Vesicle-associated membrane protein</i>
μF	Mikrofarad
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Der synaptische Vesikelzyklus	4
Abb. 2	Funktionelle Einteilung von Vesikeln bei der Exozytose: das Pool-Modell	7
Abb. 3	Modell des SNARE-SM-Protein-Zyklus bei der synaptischen Vesikelfusion	12
Abb. 4	Struktur von Snapin	16
Abb. 5	Gen- <i>Targeting</i> des Snapin-Gens	21
Abb. 6	<i>Southern Blot</i> -Analyse der Snapin- <i>Knockout</i> -Mutation	22
Abb. 7 A	Phasenkontrastmikroskopisches Bild von Wildtyp-Chromaffinzellen in Kultur	25
Abb. 7 B	Phasenkontrastmikroskopisches Bild von infizierten Chromaffinzellen in Kultur	25
Abb. 8	Ersatzschaltkreis einer „gepatchten“ Zelle	29
Abb. 9	Exzitationsspektrum für fura-2	32
Abb. 10	Kalziumkalibrierung <i>in vitro</i>	33
Abb. 11	Photolyse von gebundenem Kalzium von NP-EGTA	34
Abb. 12	Membrankapazitätszuwachs nach plötzlichem Kalziumanstieg	35
Abb. 13	Oxidation von Katecholamin-Seitenketten	37
Abb. 14	Schematische Darstellung der Herstellung von durch kathodische Tauchlackierung isolierter Karbonfaser-Mikroelektroden	38
Abb. 15	Amperometrie einer Wildtyp-Chromaffinzelle	39
Abb. 16	Simultane Messung von Amperometrie und Kapazität	40
Abb. 17	Phänotypen der Mausembryos im Entwicklungsstadium E18	43
Abb. 18	Photometrische Detektion intrazellulärer Kalziumkonzentrationen	46

Abb. 19	Einzelne Kapazitätsmessungen an Chromaffinzellen	47
Abb. 20	Kumulative Kapazitätsmessungen an Chromaffinzellen	48
Abb. 21	Größenverteilung unterschiedlicher Pools in Chromaffinzellen von Snapin Wildtyp, - <i>Knockout</i> und - <i>Rescue</i>	48
Abb. 22	Amperometrische Detektion oxidierbarer Katecholaminen nach Freisetzung aus LDCV von Chromaffinzellen	51
Abb. 23	Modell zur vorgeschlagenen Rolle von Snapin bei der Vesikelreifung und am Reifungsprozess	60

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Lösungen für die Zellkultur und Genotypisierung	19
Tab. 2	Lösungen für die Elektrophysiologie	20
Tab. 3	Primer für die Genotypisierung	26
Tab. 4	PCR-Reaktionslösung	26
Tab. 5	Thermozyklisches Temperaturprotokoll	27
Tab. 6	Durchschnittliche Größen der einzelnen Sekretionspools	50

1. Einleitung

1.1. Neurone, Synapsen und Neurotransmission

Das Gehirn ist das zentrale Steuerungs- und Regulationsorgan des Menschen, in welchem Informationen zusammengeführt, ausgewertet, gespeichert und weitergegeben werden. Ebenso ist es der Sitz für höhere geistige Leistungen wie beispielsweise Denken, Lernen, Sprache, Urteilsvermögen oder Kreativität. Das Grundelement des Gehirns ist die einzelne Nervenzelle, das Neuron. Verknüpfungen untereinander werden über spezialisierte Strukturen, die Synapsen, bewerkstelligt. Zu einer Synapse gehören die präsynaptische Endigung des ersten Neurons am Ende seines Axons, die postsynaptische Membran des zweiten Neurons am Zellkörper (Soma) oder einem Ausläufer (Dendrit), sowie der synaptische Spalt, also der interneuronale Zwischenraum. Mehr als 10^{11} Neuronen bilden im zentralen Nervensystem mehr als 10^{14} Synapsen aus, an denen in örtlich und zeitlich präzisen Mustern die synaptische Transmission, also Informationsweiterleitung von Neuron zu Neuron, erfolgt. Die Fähigkeit zur und die Art der Informationsübertragung bildet zugleich die Basis zur Informationsverarbeitung. Informationsweiterleitung kann dabei auf prinzipiell zwei Arten bestritten werden: chemisch oder elektrisch.

Elektrische Synapsen bewerkstelligen mithilfe von „*gap junctions*“ als porenbildende Proteinkomplexe eine direkte Verbindung zwischen zwei benachbarten Zellen. Elektrische Signale können dabei sehr schnell z.B. in Form von Ionenverschiebungen übertragen werden. Diese schnelle Signalübertragung findet man v.a. in Herzmuskelzellen aber auch in manchen Gliazellen.

Chemische Synapsen findet man im zentralen Nervensystem weitaus häufiger. An ihnen werden elektrische Signale in chemische umgewandelt. Als erregbare Zellen reagieren Neuronen auf eine Änderung ihres Ruhemembranpotenzials nach Überschreitung eines Schwellenpotenzials mit der Ausbildung eines Aktionspotenzials. Gelangt dieses über das Axon bis zur präsynaptischen Endigung, kommt es zu einer Umwandlung des elektrischen in ein chemisches Signal: Durch Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle erhöht sich lokal die Kalziumkonzentration, und Prozesse zur Ausschleusung von in Vesikeln gespeicherten Botenstoffen werden getriggert. Diese Botenstoffe sind

Informationsträger und physisch z.B. als Peptide oder Proteine namensgebend für die „chemische“ Synapse.

Die Informationsübertragung an Synapsen nennt man synaptische Transmission. Als einzelne Schritte gehören neben der Ausschleusung der Informationsträger (Präsynapse), ihrer Diffusion (synaptischer Spalt) zur nächsten Zelle auch die Bindung an Rezeptoren (Postsynapse) mit konsekutiver Auslösung eines elektrischen Signals. Bei der Informationsübertragung spielen die hier beschriebenen Prozesse der Exozytose eine wichtige Rolle und unterliegen einer komplexen Regulation in ihrer räumlichen Ordnung und ihrem zeitlichem Ablauf.

1.2. Exozytose

Exozytose beschreibt den Prozess, der in der Freisetzung von intrazellulär gelegenen Substanzen nach extrazellulär resultiert. Dabei verschmelzen die Membranen intrazellulär gelegener Vesikeln mit darin gespeicherten Stoffen mit der Plasmamembran und eröffnen durch Ausbildung einer Pore den intravesikulären Raum nach extrazellulär. Dieser Prozess erlaubt Zellen u. a. auf ein sich änderndes extrazelluläres Milieu zu reagieren oder miteinander zu kommunizieren.

Der basale Mechanismus der Exozytose kann prinzipiell auf zwei verschiedenen Wegen zur Sekretion führen: konstitutiv (ohne externen Reiz) oder reguliert (mit Auslösung durch bestimmte Triggersubstanzen) (Burgess and Kelly, 1987).

Der konstitutive Weg dient der Aufrechterhaltung und Wiederherstellung von Zellen und deren Funktionen, indem er neue Teile der Plasmamembran zuführt oder auch einzelne Bestandteile wie Membranproteine (Gumbiner and Kelly, 1982) eingegliedert werden.

Regulierte, also getriggerte, Exozytose spielt die wichtigste Rolle bei Ausschleusungsprozessen aus Neuronen oder anderen spezialisierten Zellen wie endokrin aktiven Zellen. Extrazelluläre Trigger der regulierten Exozytose werden in intrazelluläre Signale – Kalzium, Proteinkinasen oder auch cAMP – übersetzt, die unterschiedlich schnell und auch unterschiedlich schnelle Exozytose vermitteln. Zu triggernde Substrate sind Vesikel, die Botenstoffe beinhalten. Nach morphologischen Kriterien und anhand der Inhaltsstoffe können Vesikel in 2 Kategorien unterschieden werden: *Small clear vesicles* (SCV) sind klein, und in ihnen werden klassische zentrale Neurotransmitter wie die Aminosäureabkömmlinge Glutamat, GABA oder

Glycin gespeichert. *Large dense core vesicles* (LDCV) sind größer und stellen sich elektronenmikroskopisch dunkler dar. Sie können neben klassischen Neurotransmittern auch Neuropeptide oder biogene Amine speichern.

Die intrazelluläre Lokalisation der zur Exozytose benötigten Anteile unterliegt einer strengen räumlichen Ordnung. Vesikel befinden sich hierzu in Neuronen in spezialisierten Strukturen, der *Active zone* in der Präsynapse. In anderen Zelltypen mit regulierter Exozytose wie den Chromaffinzellen existiert kein solch spezialisiertes Kompartiment zur Transmitterfreisetzung. Chromaffinzellen weisen lediglich eine geringfügig ausgeprägte Polarität auf. Nichtsdestotrotz fällt bei beiden Zelltypen auf, dass lediglich ein Teil der Vesikel in der Nähe der Plasmamembran mit dieser fusionieren, um Exozytose zu betreiben (Sudhof, 1995).

Aber auch bei der Zeitdauer von vesikulären Exozytoseprozessen gibt es Unterschiede: Ultraschnelle Exozytose findet man bei der synaptischen Transmission. Hier findet die Exozytose von Neurotransmittern innerhalb der ersten Millisekunde nach Einfall des präsynaptischen Aktionspotenzials statt. Hingegen ist die Ausschleusung von in LDCV gespeicherten Katecholaminen in Chromaffinzellen um Faktor 10-20 langsamer. Interessanterweise finden sich aber auch *noch* langsamere Exozytoseprozesse in den selben spezialisierten neuronalen Strukturen, in denen ultraschnelle Exozytose stattfindet. Hier ist z.B. die asynchrone oder tonische Exozytose zu nennen (Kasai et al., 2012). Neuroexozytose ist also ein hochgradig spezialisierter und regulierter Prozess, an dem intensiv geforscht wird.

Diese Arbeit befasst sich mit einzelnen Schritten der regulierten Exozytose in murinen Chromaffinzellen. Das kürzlich entdeckte Protein Snapin übt Einfluss auf die Regulation von Vesikeln (LDCV) bei der Exozytose aus und wird mit zeitlich hochauflösenden elektrophysiologischen Methoden in seiner Rolle charakterisiert. Wichtige Schritte der Exozytose sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

1.3. Der synaptische Vesikelzyklus

Um für wiederholte Exozytoseprozesse zur Verfügung stehen zu können unterliegen Vesikel zyklischen Abläufen, in denen sie schrittweise wieder in den fusionsbereiten Ausgangsstatus gebracht werden. Diese Prozesse werden als der synaptische Vesikelzyklus zusammengefasst.

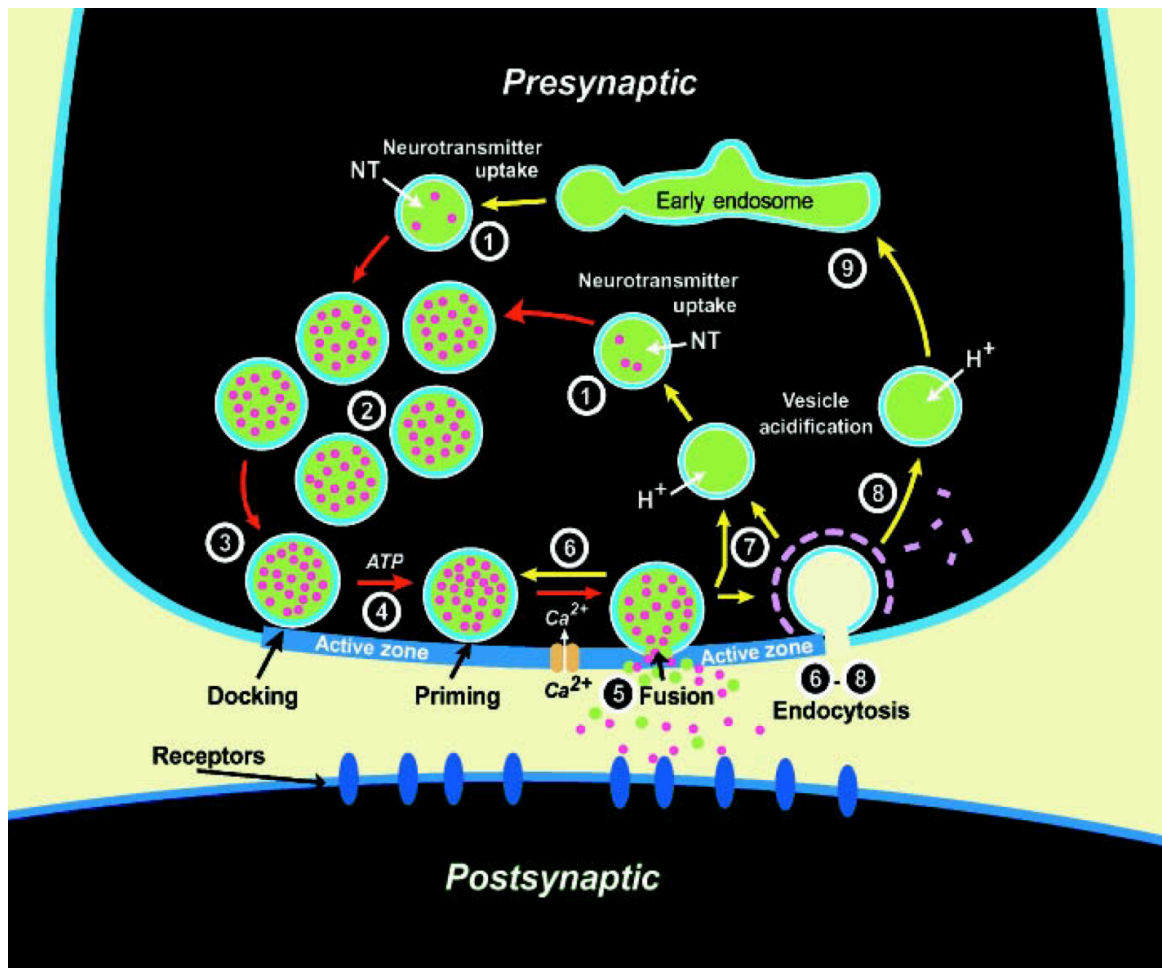


Abb. 1: Der synaptische Vesikelzyklus. (Sudhof, 2004)

Nach Südhof (Sudhof, 2004) werden in einem ersten Schritt Neurotransmitter über aktiven Transport in synaptische Vesikel verfrachtet. Diese gruppieren sich im Bereich der aktiven Zone bevor sie dort andocken (*docking*). In einem ATP-abhängigen Reifungsschritt (*priming*) erhalten sie Fusionskompetenz und öffnen eine Fusionspore infolge eines Kalziumsignals (*fusion*). Nach Transmitterfreisetzung können Vesikel, um für erneute Ausschleusungsprozesse zur Verfügung stehen zu können, dann auf grundsätzlich 3 verschiedene Arten der Endozytose und dem Recycling zugeführt werden:

- a) ohne abzudocken und durch Ansäuerung mit direkter Wiederbefüllung mit Neurotransmitter („*kiss-and-stay*“),
- b) abgedockt mit lokalem Recycling („*kiss-and-run*“), oder
- c) nach *Clathrin*-vermittelter Endozytose mit folgender Ansäuerung und Neurotransmitterbeladung jeweils mit oder ohne endosomalen Zwischenschritt (Abb. 1).

Schlüsselschritte für die synaptische Transmission sind dabei das *Docking*, das *Priming* und die Fusion. Sie erfolgen nach heutigem Verständnis (überwiegend) sequenziell.

1.4. Schlüsselschritte der Exozytose und das Poolmodell

Durch Einteilung von Vesikeln in Gruppen mit gemeinsamen Eigenschaften können die sequenziellen Abläufe bei der regulierten Neuroexozytose modellhaft dargestellt (Abb. 2) werden: Das initial vorgeschlagene Pool-Modell der regulierten Neuroexozytose zeigte die Schritte der Vesikelmaturation bis hin zur Freisetzung von in Vesikeln gespeicherten Stoffen in einem zweistufigen Modell (Heinemann et al., 1993). Für Chromaffinzellen wurde von Ashery et al. eine modifizierte Variante dieses Modells erarbeitet (Ashery et al., 2000) (Abb. 2, B). Die unterschiedlichen Zeitkonstanten der Fusionskinetiken einzelner Vesikel dienen als Basis zur Einteilung dieser Vesikel in unterschiedliche Gruppen. Einzelne Gruppen von Vesikeln werden *pools* genannt. Vesikel im selben *Pool* sind im gleichen funktionellen Status oder Reifungsschritt. Unterschieden werden der *Depot pool* (DP), der *Unprimed pool* (UPP), der *Slowly releasable pool* (SRP) und der *Readily releasable pool* (RRP).

Der *Depot pool* repräsentiert Vesikel, die eine Reserve darstellen. Sie sind noch keine weiteren Schritte, die zur gezielten Exozytose benötigt werden, gegangen und stellen den größten *Pool* dar.

Im *Unprimed pool* sind Vesikel, die sich der Plasmamembran physisch genähert haben. Diesen Schritt nennt man *Docking*. Vesikel gelten als angedockt, wenn sie auf elektronenmikroskopischen Bildern entweder direkten und sichtbaren Kontakt zur Plasmamembran aufweisen oder sich innerhalb eines Abstands eines Vesikeldurchmesser zu ihr aufhalten (Verhage and Sorensen, 2008). Erstere Möglichkeit zur Zuordnung mag dabei die Anzahl eher unter- letztere eher überschätzen (Plattner et al., 1997). In Chromaffinzellen gibt es, wie erwähnt, keine hoch spezialisierte *active zone* wie in Neuronen, wo *docking* stattfindet; allerdings gibt es auch in ihnen eine gewisse Regionalisierung mit Kalzium-„*Hot spots*“ (Mansvelder and Kits, 2000). *Docking* unterliegt in seiner (klassischen) Definition morphologischen Kriterien. Vesikel, die *gedockt* sind, können somit durch bildgebende Verfahren (Elektronenmikroskopie) identifiziert werden. Neuere, dynamische Verfahren wie Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie („*Total*

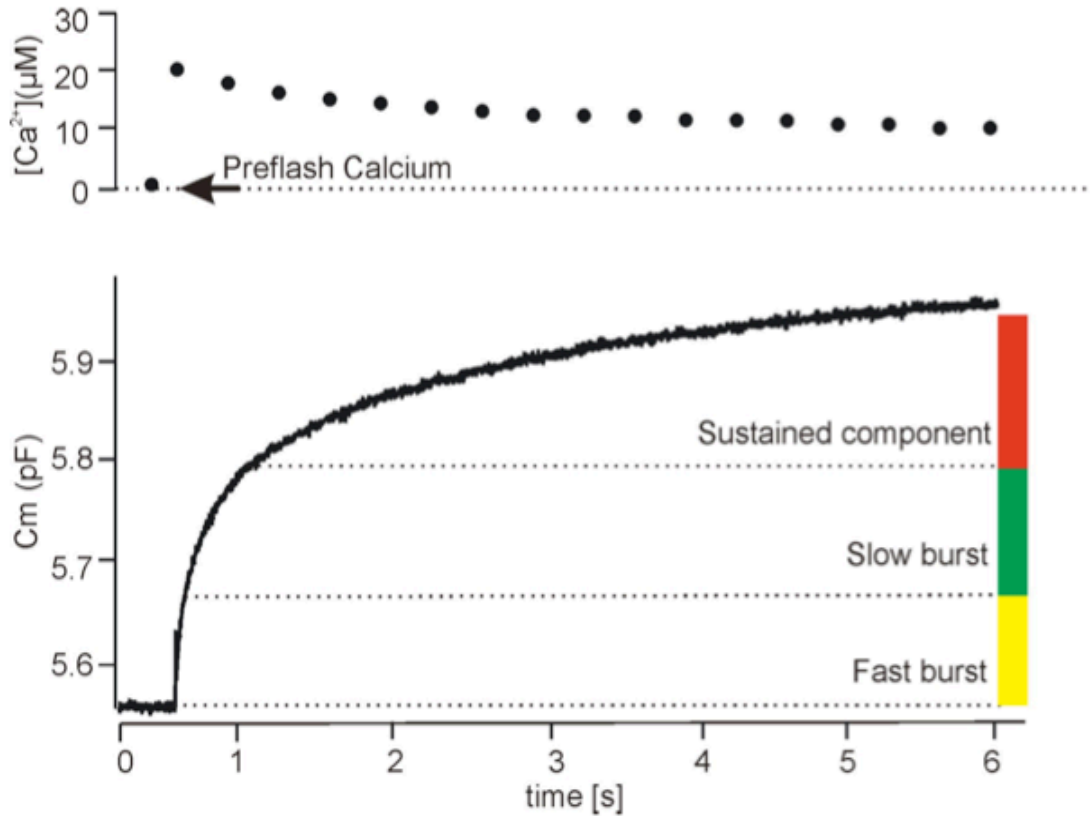
internal reflection microscopy“, TIRFM) erweitern derzeit durch Mobilitätsanalyse die Betrachtungsweise (Nofal et al., 2007).

Damit Vesikel Fusionskompetenz erlangen, ist ein weiterer Reifungsschritt, das *Priming*, notwendig. Hiernach befinden sie sich im *Slowly releasable pool* (= SRP) oder im *Readily releasable pool* (= RRP). Aus beiden („releasable“) Pools kann nun durch Membranfunktion Exozytose erfolgen. Vesikel gelten als „gereift“ und fusionsbereit, wenn sie innerhalb von etwa 1 Sekunde nach einem Kalziumsignal fusionieren (Rettig and Neher, 2002) können. Das heißt: Infolge einer plötzlichen Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration kommt es zum *exocytotic burst*, also der initialen, sehr schnellen Komponente der Exozytose, die man in Kapazitätsmessungen erfassen kann (s. Methodenteil 2.2.3.4.). Der *exocytotic burst* repräsentiert dabei zusammen die Fusion aus dem RRP und dem SRP (Abb 2, B). Diese unterscheiden sich dabei weiterhin durch unterschiedliche Fusionskinetiken: Vesikel aus dem RRP fusionieren schnell (ca. 20-50 Vesikel/Sekunde), wohingegen Vesikel aus dem SRP langsamer (ca. 3-6 Vesikel/Sekunde) fusionieren (Voets et al., 1999). Gedockte Vesikel findet man also im RRP, SRP und UPP, fusionskompetente Vesikel befinden sich im RRP und SRP.

Auf molekularer Ebene bedeuten gleiche Eigenschaften auch gleichartige molekulare Determinanten (s.u.).

Im Modell stellen „ k_0 “, „ k_1 “ und „ k_2 “ jeweils Gleichgewichtskonstanten dar, mithilfe derer sequenzielle Schritte der Vesikel in unterschiedliche Pools beschrieben werden können (Abb. 2, B). K_0 stellt die vorwärts gerichtete *Docking*-Rate, K_1 die vorwärts gerichtete *Priming*-Rate und k_2 die vorwärts gerichtete Rate der Reaktion des Wechsels zwischen RRP und SRP dar. K_0 , K_1 und K_2 sind die jeweils rückwärts gerichteten Konstanten. Der finale Fusionsschritt („*Fused vesicles*“) wie auch die *Priming*-Rate (K_1) sind kalziumabhängig (Heinemann et al., 1993). Für einzelne Wechsel in unterschiedliche *Pools* unterliegen Vesikel unterschiedlichen und z.T. mehrfachen biologischen Regulationsmechanismen. Die Wirkung unterschiedlicher modulatorischer Proteine mit konsekutiver Zugehörigkeit zu anderen Pools lässt sich im Modell in Änderungen von Gleichgewichtskonstanten beschreiben.

A



B

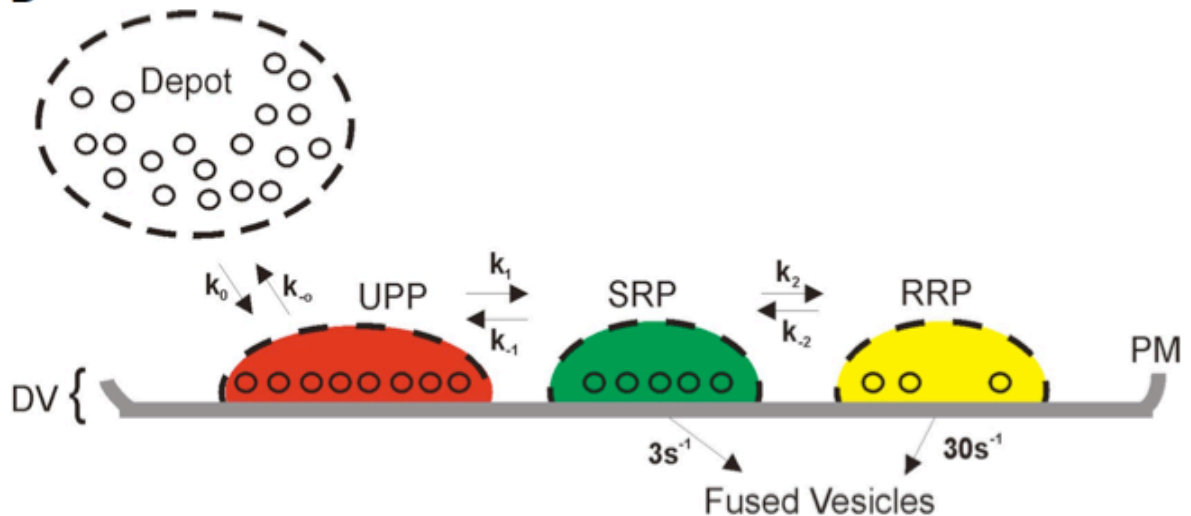


Abb. 2: Funktionelle Einteilung von Vesikeln bei der Exozytose: das Pool-Modell

A: Nach Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration von 300 nM auf 20 μM (oben) kommt es zu einem sprunghaften Anstieg der Membrankapazität (unten). Das triphasische Muster spiegelt unterschiedliche Fusionskinetiken einzelner Pools dar.

B: Kinetisches Modell der Pools. Die Farbcodierung weist auf die Zugehörigkeiten der Pools zu einzelnen Phasen der Sekretion.

Depot = depot pool, UPP = unprimed pool. SRP = Slowly releasable pool, RRP = Readily releasable pool, PM = Plasmamembran.

Modifiziert nach: (Rettig and Neher, 2002)

1.5. Chromaffinzellen als Modell für Neurosekretion

Es existieren viele Möglichkeiten synaptische Funktion in Säugetieren zu messen. Postsynaptische Antworten zu messen hat den Vorteil einer guten Zugänglichkeit für Elektroden zum großen Zellkörper (*Soma*) des Neurons. Nachteilig ist, dass die Ergebnisse die Summe aus vielen Prozessen sind: präsynaptische Exozytoseprozesse, Diffusion unterschiedlicher, freigesetzter Stoffe und all ihre Wirkungen auf die postsynaptischen Rezeptoren.

Um Neurosekretion messen zu können, ist die präsynaptische Endigung in Säugetieren allerdings zu klein, um für Elektroden zugänglich zu sein. Aus diesem Grund sind in den letzten Jahren verschiedene Präparationen von neuronalen und neuroendokrinen Zellen entwickelt worden, die unterschiedliche Vorteile aufweisen.

Da viele genetische Manipulationen an Mäusen durchgeführt werden, erscheinen Präparationen ihrer Zellen geeigneter als z.B. retinale bipolare Neurone des Goldfisch (Heidelberger et al., 1994).

Primärkulturen autaptischer Neuronen erlauben synaptische Transmission mit nur einer Elektrode an nur einem einzelnen Neuron zu vermessen (Rosenmund and Stevens, 1996). Dabei bildet das Neuron eine axonale Verbindung zu sich selbst aus (*Autapse*), sodass sowohl inhibitorische als auch exzitatorische Effekte in dem selben System untersucht werden können. Einerseits können zwar somit prinzipiell Neuronen aller Regionen des Gehirns untersucht werden, allerdings ist die intrazelluläre Kalziumkontrolle nur bei wenigen Präparationen möglich (Schneggenburger and Neher, 2000). Zudem kann man Neurosekretion nicht auf direkte Art und Weise messen.

Andere neuronale Kulturen haben andere Nachteile wie z.B. die glutamaterge *Calyx of Held*-Synapse, deren Größe zwar Zugangsmöglichkeiten für Elektroden bieten, allerdings Entwicklungsveränderungen in der zweiten postnatalen Woche unterliegt, sodass perinatal letale Phänotypen (wie in dieser Arbeit) nicht untersucht werden können (Futai et al., 2001).

Viele neuroendokrine Zellen eignen sich im Besonderen zur Beobachtung neuronaler Exozytoseprozesse, da sie viele Eigenschaften mit Neuronen teilen. Pankreatische Alpha- (Glucagon) und Betazellen (Insulin) (Gonzalez-Velez et al., 2012 und Eliasson et al., 2003) sowie adrenale Chromaffinzellen (Katecholamine) und PC12-Zellen (Phäochromozytomzellen) sind dabei die am wohl häufigsten

verwendeten.

In meiner Arbeit habe ich deswegen die adrenale Chromaffinzelle als Modell zur Neurosekretion herangezogen. Sie ist ein anerkanntes Modell zur Evaluation kalziumabhängiger Exozytoseprozesse (Rettig and Neher, 2002). Embryologisch sind sie neuroektodermalen Ursprungs und entwickeln sich aus den gleichen Vorläuferzellen der Neuralleiste, aus denen sich sympathische Neurone ausbilden. Sie sind somit als modifizierte sympathische (erste) Neuronen anzusehen (Morgan and Burgoyne, 1997). Chromaffinzellen finden sich im Nebennierenmark und werden als Teil des sympathischen Nervensystems durch sympathische Nervenendigungen innerviert. Acetylcholin dient bei Aktivierung als Transmitter und depolarisiert die Chromaffinzelle, was zum Kalzium-Influx und zur Exozytose führt. Die physiologische Rolle der aus Chromaffinzellen sezernierten Katecholamine (überwiegend Noradrenalin, aber auch Adrenalin) liegt in deren Wirkung auf kardiozirkulatorische Parameter wie Blutdruck, Herzfrequenz und Schlagvolumen sowie der Einflussnahme im Energiestoffwechsel auf das Gleichgewicht zwischen Insulin und Glucagon. Katecholamine werden in *large dense core* Vesikeln (LDCV) gespeichert. Gemeinsamkeiten von Chromaffinzellen mit Neuronen sind deren beider Exzitabilität mit der Möglichkeit zur Ausbildung von Aktionspotenzialen und schnelle Transmitterfreisetzung. Entscheidend, um als Neurosekretionsmodell dienen zu können, ist auch der gleichartige Aufbau der Exozytosemaschinerie in beiden Zelltypen (Mansvelder and Kits, 2000), was sich u.a. durch ihre Blockierbarkeit durch clostridiale Neurotoxine (s.u.) und die Kalziumabhängigkeit der Exozytose zeigt.

Unterschiede finden sich hauptsächlich in der Architektur der Zellen: Chromaffinzellen haben ein sphärisches äußeres Erscheinungsbild und besitzen weder Axone noch Dendriten. Diesen Umstand kann man sich für direkte Messungen ausgeschleuster Stoffe (s. Amperometriemessungen) oder der Berechnung der Oberfläche (s. Kapazitätsmessungen) zunutze machen. Auch wenn die Binnenstrukturen des Exozytoseapparats gleichartig aufgebaut sind, haben Chromaffinzellen keine spezialisierte Strukturen wie die *Activ zone* der Prä- oder die Postsynaptische Verdichtung (PSD) der Postsynapse. Aber auch in Chromaffinzellen finden sich Regionalisierungen, die am ehesten spezifischen Aufgaben zuzuordnen sind wie Kalzium-„*Hot spots*“, an denen aufgrund lokal höherer Konzentrationen von Kalzium auch eine höhere Wahrscheinlichkeit zur Initiierung von Exozytoseprozessen zu vermuten ist (Becherer et al., 2003). Trotzdem gibt es auch

Hinweise, die dagegen sprechen (Wu et al., 2009). Die fehlende Notwendigkeit zur Ausbildung höchst spezialisierter Kompartimente liegt am ehesten an der einfachen, endokrinen Art der Exozytose (Stevens et al., 2011).

Die grundlegenden Gemeinsamkeiten machen Chromaffinzellen zu einem exzellenten Modell zur Untersuchung neurosekretorischer Prozesse.

1.6. Molekularer Mechanismus der Exozytose und beteiligte Strukturen

(Proteine)

Vor einem funktionellen Hintergrund unterlaufen die sich in den jeweiligen *pools* befindlichen Vesikel unterschiedliche molekulare Veränderungen. So wird zum Beispiel angenommen, dass ein Unterschied der Zuordnung von Vesikel zum RRP im Gegensatz zum SRP durch eine unterschiedliche SNARE-Komplex-Formation zu erklären ist: Für eine schnelle Membranfusion findet sich im RRP ein „fest assemblierter“ *Trans*-SNARE-Komplex wohingegen im SRP ein noch locker zusammengesetzter *Binary*-SNARE-Komplex vorliegt. Zur Übersicht siehe (Jahn et al., 2003) und (Kasai et al., 2012). Das Verständnis über Zusammenhänge anderer molekularer Grundlagen zu physiologischen Beobachtungen ist für viele Abläufe noch nicht vollständig.

Die molekulare Basis der Exozytose spiegelt das Zusammenspiel einer Vielzahl von beteiligten Strukturen wider. Die wichtigsten möchte ich hier vorstellen bevor der Prozess der Exozytose auf molekularer Ebene beschrieben werden soll.

1.6.1. SNARE-Proteine

SNAREs (*Soluble NSF attachment protein receptors*) stellen die Schlüsselkomponenten zur Membranfusion dar (Jahn and Scheller, 2006) und sind Ziele clostridialer Neurotoxine, die einzelne SNARE-Proteine spezifisch spalten (Jahn and Niemann, 1994). In Abwesenheit von funktionstüchtigen SNARE-Proteinen kommt es zum fast vollständigen Sistieren der regulierten Exozytose (Schoch et al., 2001; Washbourne et al., 2002).

SNAREs stellen eine Familie von Proteinen dar, zu denen Syntaxin, SNAP-25 (*Synaptosome-associated protein of relative molecular mass 25 kDa*) und

Synaptobrevin (auch: *VAMP* = *Vesicle-associated membrane protein*) gezählt werden. Ein Charakteristikum für alle Mitglieder der SNARE-Familie ist ein achtegliedrig repetitives („*Heptated repeat*“) Strukturmotiv mit etwa 60 Aminosäuren Länge: das SNARE-Motiv (Jahn and Scheller, 2006). Einzelne SNARE-Motive sind in Lösung im wesentlichen unstrukturiert. Kommen allerdings 4 SNARE-Motive zusammen, so bilden sie gemeinsam einen stabilen, α -helikalen, ternären Komplex aus, den SNARE-Kernkomplex (Sutton et al., 1998). Hierin sind die vier helikalen Bündel der SNARE-Proteine über ihre Motive miteinander verflochten. Zentral im Komplex interagieren 4 geladenen Aminosäurereste: Arginin („R“) von VAMP2, Glutamin (Qa) von Syntaxin und weitere 2 Glutamine (Qb und Qc) von SNAP25, sodass man SNAREs einteilen kann in R-, Qa-, Qb-, und Qc-SNAREs (Fasshauer et al., 1998). Eine andere Möglichkeit zur Einteilung erfolgt anhand ihrer Verankerung an Vesikeln (= v-SNAREs: Synaptobrevin/VAMP) oder Zellmembran (*Target membrane* = t-SNAREs: Syntaxin-1 und SNAP-25). Die Formation „SNARE-Komplex“ ist außerordentlich stabil, sodass sie *in vitro* quasi nicht gelöst werden kann (Fasshauer et al., 1997; Hayashi et al., 1994). SNARE-Komplexe unterliegen zyklischen Abläufen: Nach Assemblierung wechseln sie in eine *trans*-Formation und nach der Fusionsreaktion in cis-Komplexe (Abb. 3). Sie werden dann durch die ATPase NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) und SNAP (*Soluble NSF attachment protein*) zerlegt, sodass einzelne SNARE-Proteine erneut zur Verfügung stehen (Sollner et al., 1993).

Die im SNARE-Komplex generierte Energie dient zur Überbrückung der Energiebarriere, die zur Annäherung und Fusion der sich sonst abstoßenden Lipiddoppelschichten der Vesikel- und Plasmamembran benötigt wird (Hanson et al., 1997). Mechanisch betrachtet stellt eine sich Stück für Stück reißverschlussartig verzahnende Zusammensetzung („*N- to C-terminal zippering model*“) der SNARE-Proteine diese Energie bereit (Sorensen et al., 2006).

Neben den SNARE-Motiven weisen die Proteine noch individuelle Charakteristika auf: Synaptobrevin/VAMP hat eine Transmembrandomäne zur Verankerung an Vesikel. Syntaxin kann eine offene (aktive) und eine geschlossene (inaktive) Konformation annehmen und hat neben einer Transmembrandomäne eine sogenannte H_{abc}-Domäne, die intramolekular am SNARE-Motiv interagiert und über Konformationsänderungen von Syntaxin die Zusammenstzung des SNARE-Komplex verhindert (Dulubova et al., 1999; Toonen and Verhage, 2003). SNAP-25 hat neben

seinen zwei SNARE-Motiven einen modifizierten Cystein-Rest, der der Verankerung an Membranen dient (Sorensen et al., 2003).

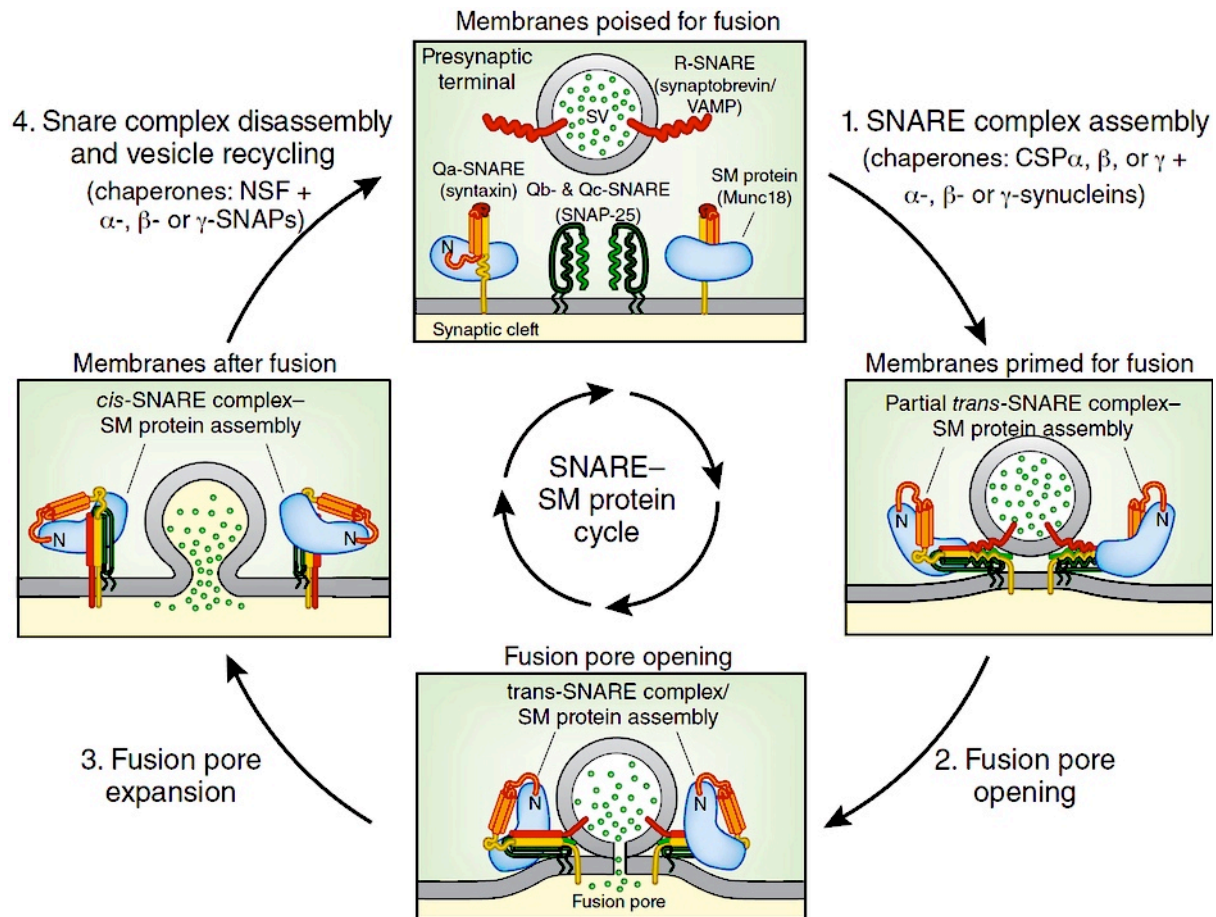


Abb. 3: Modell des SNARE-SM-Protein-Zyklus bei der synaptischen Vesikelfusion. (Sudhof, 2013a)

1.6.2. SM-Proteine

Munc (**M**ammalian **unc**) –Proteine sind die 60-70 kDa Säugetierhomologe der *unc*-Proteine aus *C. elegans* bzw. *sec*-Proteine aus Hefen. **Sec**- und **Munc**-Proteine sind in der Evolution hochgradig konservierte Proteine und werden als **SM**-Proteine zusammengefasst. Entdeckt wurden sie in genetischen Screenings an *C. elegans*, die durch ein unkoordiniertes (*Uncoordinated* = „*unc*“) Bewegungsmuster aufgefallen waren (Brenner, 1974).

Munc18 wird in Neuronen und neuroendokrinen Zellen exprimiert und hat dort

vielfältige regulative Aufgaben. Es stabilisiert u.a. die geschlossene Form von Syntaxin-1 und reguliert (behindert) so die Ausbildung des SNARE-Komplex (Toonen et al., 2005). In Neuronen führt eine Munc18-1-Deletion zur vollständigen Auslöschung der Neurosekretion aus synaptischen Vesikeln (Verhage et al., 2000), wohingegen in Chromaffinzellen eine Reduktion der Neurosekretion um lediglich 10% gesehen werden konnte. Allerdings war hier auch die Störung des *Dockings* zu sehen. Munc18 ist in weitere Prozesse involviert wie die Ausbildung des SNARE-Komplex, am *Priming* und dem Fusionsprozess selbst (Deak et al., 2009; Diao et al., 2010; Gulyas-Kovacs et al., 2007).

Munc13 ist ein *Priming*-Faktor in Neuronen und Chromaffinzellen. Es hat viele Domänen und interagiert hierüber mit unterschiedlichsten Proteinen. Durch Interaktion mit Syntaxin, das es in eine offene Form überführt, bewerkstelligt Munc13 die Ausbildung des SNARE-Komplex (Betz et al., 1997). Andere Interaktionen ziehen eine Modulation der Exozytose beziehungsweise im Rahmen der synaptischen Transmission dann auch an der synaptischen Plastizität nach sich. Als wichtigste wäre hier das Zusammenspiel mit den Bindungspartnern Rab3 und RIM zu nennen, mit denen es gemeinsam einen Komplex („*tripartite Rab3/RIM/Munc13-complex*“) bildet, der Vesikel der *Priming*-Maschine räumlich zuführen kann (Dulubova et al., 2005). In Neuronen führt eine Deletion von Munc13-1 (Augustin et al., 1999) zu einer inkompletten und zusammen mit der Deletion seiner Isoform Munc13-2 (Varoqueaux et al., 2002) zu einer vollständigen Auslöschung der synaptischen Transmission, was auf deren Redundanz hinweist. Die Aufgaben seiner Isoformen liegen in Neuronen in einer unterschiedlichen Kontrolle im *Priming* und der Kurzzeitplastizität (Rosenmund et al., 2002). In Chromaffinzellen reduziert sich die Exozytose im Munc13-1/-2/-3 Tripelknockout um mindestens 50%. Knockouts der einzelnen Isoformen von Munc13 haben einen geringfügig weniger ausgeprägten Effekt, und auch in Chromaffinzellen scheinen die einzelnen Isoformen z.T. redundante Effekt zu erzielen (Shin, 2008). Umgekehrt kann durch Überexpression von Munc13-1 in Chromaffinzellen eine Steigerung der Exozytose um Faktor 3 gesehen werden (Ashery et al., 2000). Für die Funktion von Munc13 an sich sind vor allem die beiden Munc-Homologie-Domänen, MHD, (*priming*) und eine C₂-Domäne (Ca²⁺- und sekundär Phospholipidbindung) wichtig (Basu et al., 2005; Stevens et al., 2005).

1.6.3. CAPS

CAPS (*Calcium dependent activator protein for secretion*) ist ein anderer *Priming*-Faktor in Neuronen (Jockusch et al., 2007) und Chromaffinzellen (Stevens and Rettig, 2009) und wird dort in 2 Isoformen exprimiert. Ein Einfluss auf das *Docking* wird kontrovers diskutiert (Hammarlund et al., 2008), ist in Chromaffinzellen aber nicht zu sehen (Liu et al., 2008). Unter anderem finden sich eine Kalzium bindende C₂-Struktur (Ca²⁺- und sekundär Phospholipidbindung), eine Munc-Homologie-Domäne (MHD), die eine Rolle beim *Priming* durch Bindung an Syntaxin einnimmt (James et al., 2009) und eine *Pleckstrin* Homologie-Domäne (PH) als Verbindung zum Signaltransduktor PIP₂ (Grishanin et al., 2004). Beide Isoformen werden in Abhängigkeit vom Gewebe (Sadakata et al., 2007) und – v.a. in neuroendokrinen Zellen – in Abhängigkeit von der Entwicklungsstufe (Speidel et al., 2005) exprimiert. In Chromaffinzellen ist bei Depletion von CAPS-1 die Beladung von Vesikeln mit Katecholaminen, nicht aber deren eigentliche Fusion mit der Plasmamembran wesentlich gestört. Im CAPS-1/-2-*Doppelknockout* hingegen zeigt sich eine deutliche reduzierte Exozytose, wobei jeweils beide Isoformen die Sekretion wieder herstellen können. CAPS bewerkstelligt im *Priming* überwiegend die Überführung von Vesikeln vom SRP in den RRP und ist am Auffüllungsprozess von LDCV beteiligt (Liu et al., 2010).

1.6.4. Synaptotagmin

Synaptotagmine (Syt) sind die Kalziumsensoren für die schnelle Exozytose und haben ein molekulares Gewicht zwischen 45-90 kDa. Sie beeinflussen den letzten Schritt in der Exozytose, die Membranfusion. Von den vielen beschriebenen Isoformen kommen Synaptotagmin-1 und -7 in Chromaffinzellen vor und triggern hier nahezu die gesamte kalziumabhängige Exozytose mit allerdings unterschiedlichen Geschwindigkeiten: Syt-1 schneller als Syt-7 (Schonn et al., 2008). Synaptotagmine besitzen zwei C₂-Domänen, über die sie Kalzium binden, eine funktionsfähige C₂B-Domäne ist zum Funktionserhalt obligat. Synaptotagmin-1 interagiert mit vielen Bindungspartnern – u.a. anderen Synaptotagminen, Syntaxin, SNAP-25, VAMP-2, dem binären Syntaxin/SNAP-25-Komplex und dem SNARE-Komplex (Kasai et al., 2012). Als Hauptwirkungsmechanismus wird das Zusammenführen von Vesikel- und

Plasmamembran in Kooperation mit den SNARE-Proteinen angesehen. Daneben wird die Membranfusion beschleunigt durch Interaktion des hochpositiven, elektrostatischen Potenzials der C₂B-Domäne mit negativ geladenen Phospholipid-Köpfen beider Membranen (Arac et al., 2006). Auch kann durch Verformung der Membranen eine niedrigere Aktivierungsenergie zur Fusion erzielt werden (Martens et al., 2007).

1.6.5. Zusammenspiel der Proteine

Das Zusammenspiel dieser Proteine ermöglicht die Annäherung der Vesikel an die Plasmamembran (*Docking*) und führt zu einer Bereitstellung fusionskompetenter Vesikel (*Priming*). Nach einem Kalzium-Trigger kommt es zum Verschmelzen von Vesikel- und Plasmamembran und so zur Exozytose.

Beim *Docking* werden Vesikel durch den Rab3/RIM/Munc13-Komplex der *Priming*-Maschine räumlich näher gebracht. Über Stabilisierung von Syntaxin-1 in seiner geschlossenen (inaktiven) Form wird durch Munc18 die Ausbildung des SNARE-Komplex behindert.

Während des *Primings* finden die SNARE-Proteine Synaptobrevin/VAMP, Syntaxin und SNAP-25 zusammen und bilden zunächst die lockere *trans*-SNARE-Konfiguration aus. Dies wird durch Munc13 ermöglicht, das Munc18 aus seiner Bindung verdrängt. Vesikelständiges Synaptotagmin ist der Kalziumsensor und katalysiert das schnelle Zusammenführen von Vesikel- und Plasmamembran während des Kalziumsignals. Complexine assistieren Synaptotagmin durch Aktivierung und „Festklemmen“ der SNARE-Fusionsmaschinerie. CAPS vermag durch Bindung an Syntaxin die Exozytosegeschwindigkeit (Poolzugehörigkeit) zu beeinflussen. Eine Vielzahl weiterer regulativer Proteine sind beschrieben worden (Sudhof, 2013b).

1.6.5. Snapin

Snapin ist ein Protein mit einer Länge von 136 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 15 kDa. Es wird sowohl in Neuronen als auch in Chromaffinzellen (und anderem nichtneuronalem Gewebe) gefunden, subzellulär in Neuronen, dabei exklusiv an synaptischen Vesikeln. Amino-terminal findet sich ein hydrophobes

Segment für seine Integration in die Vesikelmembran, in der carboxy-terminalen Region eine *Coiled-coil*-Struktur für Protein-Protein-Interaktionen. Ähnliche *coiled-coil*-Strukturen finden sich in vesikulären Fusionsproteinen, in denen sie die Bindungsdomäne für SNARE-Komponenten sind.

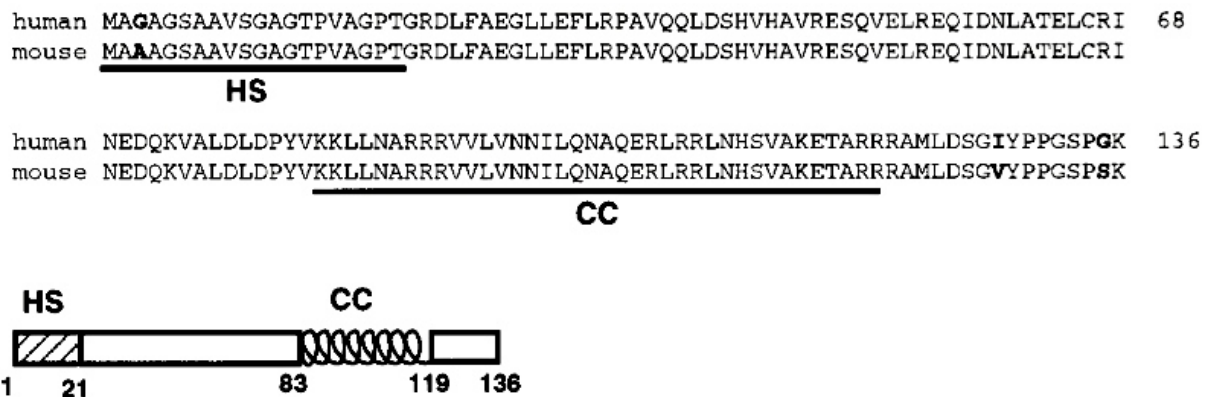


Abb. 4: Struktur von Snapin

oben: humane und murine Aminosäuresequenz mit 98% Homologie
unten: Struktur der Domänen; HS = hydrophobes Segment, CC = *coiled-coil*.
(Ilardi et al., 1999)

Snapin zeigt *in vitro* eine Bindung an SNAP-25 im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1, wobei für die Bindung die c-terminalen Aminosäuren 79-136 ausreichen („Snapin-CT“). Rekombinantes Snapin blockiert die Assoziation von SNAP-25 mit dem SNARE-Komplex. Untersuchungen an kultivierten ganglionären Neuronen (*superior cervical ganglion neurons*, SCGN) der Maus geben Hinweise auf die funktionellen Effekte von Snapin: Nach Injektion („Snapin-CT“) in die präsynaptische Ganglienzelle verursacht Snapin eine verminderte postsynaptische Antwort, gemessen als exzitatorisches postsynaptisches Potenzial (EPSP). Dies deutet auf eine inhibierende Rolle von Snapin in der synaptischen Transmission (Ilardi et al., 1999).

Phosphorylierung durch PKA (cAMP abhängige Proteinkinase A) verstärkt die Bindung von Snapin an SNAP-25. Durch gezielte Mutation (S50D) kann der phosphorylierte Zustand von Snapin nachgeahmt werden. In biochemischen Essays kann diese mutierte Form (S50D) eine verstärkte Bindung zwischen Synaptotagmin und dem SNARE-Komplex herbeiführen. Als Ziel von PKA ist Snapin somit in einen cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweg eingebettet (Chheda et al., 2001). Eine solche Regulation durch *second messenger* kann für Proteine des

Exozytoseapparats eine potentielle Rolle bei der synaptischen Plastizität bedeuten und damit in neuronalen Netzwerken die Ausbildung von Gedächtnis und Lernen mitverantworten (Sudhof, 1995). Für SNAP-25 ist gezeigt worden, dass dessen Phosphorylierung durch PKA für die Bereitstellung von Vesikeln im fusionskompetenten Pool verantwortlich ist (Nagy et al., 2004). In Chromaffinzellen führt eine Überexpression der phosphorylierungsnachahmenden Form („*Phosphomimetic*“, S50D) von Snapin auch zu einer gesteigerten Anzahl an fusionskompetenten Vesikeln und führt dadurch zu einer vergrößerten (*Burst*-) Amplitude stimulierter Exozytose *in vitro* (Chheda et al., 2001).

In kultivierten hippokampalen Neuronen zeigt sich bei Überexpression mit der gleichen S50D-Mutante eine verminderte Antwort nach Exposition mit hypertoner Glucose-Lösung bei gleichbleibend großem EPSC (*Excitatory postsynaptic current*, exzitatorischer postsynaptischer Strom), was auf eine reduzierte Anzahl von Vesikeln im RRP hindeutet. Eigentlich sind diese Ergebnisse in Chromaffinzellen und Neuronen nicht vollständig kongruent, werden allerdings mit Unterschieden aus den jeweiligen Modellsystemen erklärt (Thakur et al., 2004). In beiden Modellen zeigen sich also die modulatorischen Eigenschaften des Proteins und auch dessen Rolle als Ziel von Proteinkinase A.

1.7. Ziel dieser Arbeit

Das eingehende Verständnis von regulierten Exozytoseprozessen ist von grundlegender Bedeutung, da die Modulierbarkeit einzelner Schritte der synaptischen Transmission die Grundlage u.a. für Lernen und Gedächtnis widerspiegelt. Gewonnene Erkenntnisse über die Funktionsweise von individuellen Synapsen oder gar ganzer neuronaler Netzwerke dienen dem Verständnis neurologischer bzw. neurogener Erkrankungen. Viele an der Exozytose beteiligte Proteine sind entdeckt und bereits charakterisiert worden. Nichtsdestotrotz werden auch weiterhin neue und für die Exozytose relevante Proteine entdeckt.

Snapin ist ein solches Protein, das als Bindungspartner von SNAP-25 beschrieben wurde (Ilardi et al., 1999). In ersten funktionellen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass Snapin zu einer stärkeren Bindung zwischen SNAP-25 und dem SNARE-Komplex beiträgt. Ko-Immunopräzipitations- und Überexpressionsexperimente mit rekombinantem Snapin (Chheda et al., 2001; Thakur et al., 2004)

zeigten bereits in Neuronen und Chromaffinzellen einen Einfluss auf die Anzahl von Vesikeln im fusionskompetenten Pool, sodass eine modulatorische Rolle von Snapin an der regulierten Exozytose postuliert wurde. Ein genauer molekularer Wirkmechanismus wurde allerdings noch nicht beschrieben.

Ziel dieser Arbeit ist es die funktionelle Rolle von Snapin im Neurosekretionsprozess zu ergründen. Erstmals wird hierzu bei Snapin defizienten Mäusen Kalzium getriggerte Exozytose durch elektrophysiologische Methoden untersucht. Die adrenale Chromaffinzelle der Maus wurde hierzu als Modell gewählt. Die mittels *Patch clamp*-Technik und Amperometrie erhobenen Ergebnisse sollen zum besseren Verständnis über die Funktion von Snapin beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Alle Reagenzien, Medien und Lösungen wurden von folgenden Herstellern bezogen (wenn nicht explizit anders markiert):

Invitrogen, Eggenstein-Leopoldshafen; Sigma, St. Louis, MO, USA; Worthington, Lakewood, NJ, USA; Merck, Darmstadt; Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.1. Medien und Lösungen für Zellkultur und Elektrophysiologie

Locke's Lösung	NaCl	154 mM
	KCl	5.6 mM
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0.85 mM
	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	2.15 mM
	Glucose	10 mM
		steril gefiltert pH 7.4 312 mosm
Papain-Lösung	L-Cystein	50 mg
	CaCl ₂	2.5 ml 100 mM
	EDTA	2.5 ml 50 mM
	Papain	35 U/ml
	in DMEM	250 ml
		in 2 ml Aliquots steril gefiltert
Inaktivierungs-Lösung	fetales Kalbserum	25 ml
	Albumin	625 mg
	Trypsininhibitor	625 mg
	in DMEM	225 ml
		in 10 ml Aliquots
		steril gefiltert
Kulturmedium für Chromaffinzellen	Penicillin / Streptomycin	2 ml
	Insulin-Transferrin-Selenium-X	5 ml
	in DMEM	500 ml
TAE	Tris	40 mM
	Essigsäure 0,11% EDTA	1 mM
		pH 8.0

Tab. 1: Lösungen für die Zellkultur und Genotypisierung

Intrazellulär-Lösung	Cs-Aspartat	105 mM
	Mg ²⁺ -ATP	2 mM
	Na ₂ GTP	0.3 mM
	HEPES	33 mM
	Mg ²⁺ -fura-2 AM	0.4 mM
	CaCl ₂	4 mM
	fura-4 AM	0.4 mM
	NP-EGTA	5 mM
		pH 7.2 307 mOsm
Extrazellulär-Lösung	NaCl	145 mM
	KCl	2.4 mM
	HEPES	10 mM
	MgCl ₂	4 mM
	CaCl ₂	1 mM
	Glucose	10 mM
		pH 7.4 310 mOsm
10x Base	NaCl	1445 mM
Extrazellulär-Lösung	KCl	24 mM
	HEPES	100 mM
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	40 mM
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mM
		pH 7.5 297 mOsm

Tab. 2: Lösungen für die Elektrophysiologie

2.2. Methoden

2.2.1. *Knockout*-Mäuse

Die vorliegende Arbeit wurde an murinen Chomaffinzellen in Primärkultur durchgeführt, die defizient waren für das Snapin-Gen. Da die gentechnische Manipulation einer Maus weit über die Möglichkeiten eines elektrophysiologischen Labors hinaus geht, wurde dies in Kooperation im Labor von Professor Zu-Hang Sheng in den *National Institutes of Health* in Bethesda, Maryland, USA durchgeführt. Die Tierhaltung und -aufzucht inklusive Genotypisierung erfolgte vor Ort. Da die Arbeit überwiegend an genmanipulierten Tieren durchgeführt wurde, sollen aufgrund der Wichtigkeit im Folgenden die Schritte der Generierung der Snapin-*Knockout*-Maus erläutert werden.

2.2.1.1. Snapin *Knockout*-Linie

Das Prinzip der Herstellung der Snapin-Gen-Deletion folgt dem der Erstbeschreiber (Thomas and Capecchi, 1987). Kurz gesagt wird ein Zielvektor generiert, indem 2.0 kb des Snapin-Gens durch eine PGKneo-Kassette (Phosphoglycerat-Kinase (PGK) mit Neomycin Resistenzgen am PGK-promoter) ersetzt wurden (Abb. 5).

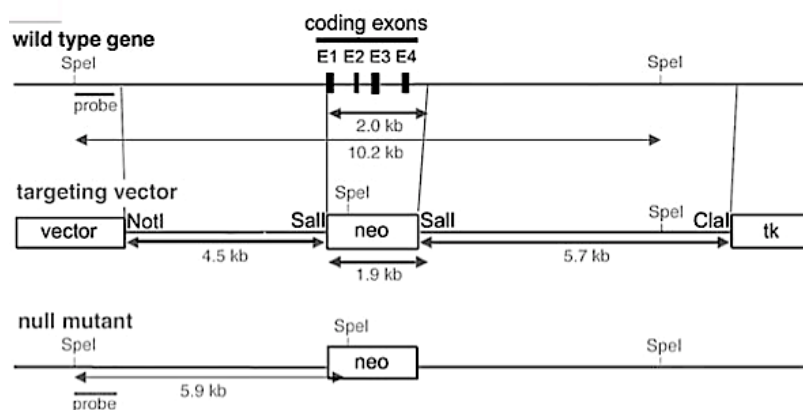


Abb. 5: Gen-Targeting des Snapin Gens

Im oberen Teil das Wildtyp-Snapin-Gen, bei dem die 4 codierenden Exons (E1 bis E4) als Ziel für den *Targeting vektor* dienen, welcher in der mittleren Zeile dargestellt ist.

Im unteren Teil das durch homologe Rekombination in embryonische Stammzellen transferierte, mutierte Gen. Spe1, Not1, Sal1 und Cla1 zeigen die entsprechenden Restriktionsenzymschnittstellen, der Balken den Sondenbeginn für die Southern Blot DNS-Analyse. (Tian et al., 2005)

Ein negativer Selektionsmarker wird mit einem HSV-1 (Herpes-Simplex-Virus-1)-Thymidin-Kinase-Gen angeschlossen. Nach Transfektion embryologischer Stammzellen (zuvor aus Blastozysten der C57BL/6 Mauslinie gewonnen und kultiviert) mit dem Zielvektor erfolgt darin homologe Rekombination. Auf diese Weise findet eine gezielte Genmutation statt („*Gene targeting*“).

Durch DNS-Analyse mithilfe von *Southern Blot* können rekombinante Stammzellklone identifiziert werden bevor sie via Mikroinjektion wieder in Blastozysten einer C57BL/6 Mauslinie gelangen. Somit können chimäre Mäuse gezüchtet werden, die das veränderte Gen, also das Snapin defiziente Allel, weitervererben („*Germline transmission*“). Die Identifikation der jeweiligen genomischen Veränderungen, also wildtyp, heterozygot oder homozygot, der Nachkommen wurde durch *Southern Blot*-Analyse bewerkstelligt (Abb. 6).

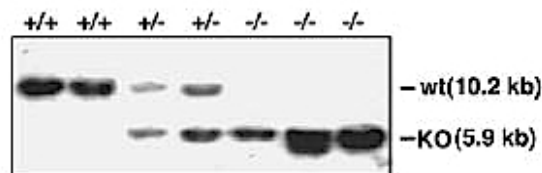


Abb. 6: *Southern Blot*-Analyse der Snapin-Knockout-Mutation

Hierzu wurde genomische DNS von Mausschwänzen verwendet. +/+ zeigt einen Snapin-Wildtyp an, +/- einen heterozygoten Genotyp für die Snapin-Mutation, -/- einen homozygoten Genotyp. In der Analyse tritt anstelle des 10.2 kb Fragments für das Snapin-Wildtyp Gen nun das 5.9 kb große Fragment, das sich durch die neu inserierte PGKneo Kasette und die nun neue *SpeI* Schnittstelle erklären lässt. (Tian et al., 2005)

2.2.1.2. Snapin-Rescue

Um die Spezifität der funktionellen Effekte der Snapin-Nullmutation aufzuzeigen, wurden *Rescue*-Experimente, in denen das Wildtyp-Snapin-Gen wieder in Chromaffinzellen einer Mausnullmutante eingeführt wurde, durchgeführt.

Als etabliertes Genexpressionsverfahren mit dem *Semliki Forest Virus* (SFV) (DiCiommo and Bremner, 1998; Liljestrom and Garoff, 1991, 2001) wurde analog dem Protokoll für Chromaffinzellen von Ashery et al. (Ashery et al., 2000) vorgegangen. Das *Semliki Forest Virus* gehört als Alphavirus zur Gattung der Togaviren. Die Virus-RNA hat positive Polarität, die Basenabfolge entspricht also der einer mRNA. Hieraus ergibt sich der Vorteil, dass nach Infektion von Chromaffinzellen mit dem Virus die hierin eingeführten Proteine bereits wenige

Stunden später exprimiert werden. Weiterhin sind zytopathogene Effekte, die Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration, Leckströme oder auch Einfluss auf die Wiederauffüllungskinetiken depletierter Pools haben könnten, ausgesprochen gering bzw. erst stark verzögert in ihrem Auftreten (Ashery et al., 1999). Eine modifizierte, also humanpathogenitätsgeminderte, Form des *Semliki Forest Virus* (pSFV1, Invitrogen, Eggenstein-Leopoldshafen) diente dazu, ein mit GFP fusioniertes Snapin-Wildtyp-Gen, das durch Klonierung in das pSFV1-Virusgenom inseriert wurde, in infizierten Chromaffinzellen exprimieren zu lassen (Abb. 7 B). Das Virus wurde von Dr. Ulf Matti aus unserem Labor wie bei Wei et al. (Wei et al., 2000) kloniert und bereitgestellt.

Für *Rescue*-Experimente wurde ein 0,5 ml Falcon-Röhrchen mit 300 μ l gefrorener Virus-Lösung aufgetaut und mit 300 μ l DMEM-Lösung zusammengebracht. Zur Virusaktivierung wurden 100 μ l Chymotrypsin (2 mg/ml, Boehringer, Mannheim, Deutschland) ergänzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde zur Inaktivierung des Chymotrypsin 110 μ l Aprotinin (6 mg/ml, Boehringer, Mannheim) gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Kultivierte Chromaffinzellen (s.u.) mit der Snapin Nullmutation wurden dann 5-8 Stunden vor Gebrauch infiziert.

Die Proteinexpression konnte über ein Anregungsmodul (*Polychrome IV*, T.I.L.L. Photonics, Germany) bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm anhand von grüner Fluoreszenz aufgrund der GFP-Markierung identifiziert werden.

2.2.2. Zellkulturen

Die elektrophysiologischen Versuche in dieser Arbeit wurden an murinen Chromaffinzellen von Mausembryos (E18) in Primärkultur durchgeführt.

2.2.2.1. Präparation und Kultivierung isolierter Chromaffinzellen der

Maus

Hierzu wurden schwangere heterozygote Weibchen nach cervikaler Dislokation dekapitiert und Mausembryos mittels Kaiserschnitt zur Welt gebracht. Diese wurden unmittelbar auf Eis (ohne direkten Kontakt) gekühlt bevor die Präparation der Nierenloge unter dem Mikroskop (Nikon eclipse TS100, Nikon, Japan) begann. Sezierte embryonale Nebennieren wurden in gekühlter *Locke's* Lösung (5-8°C) in eine Petrischale verbracht, in der sie im Anschluss ausschließlich mit einer Pinzette (um Gewebstraumata zu reduzieren) von Bindegewebe befreit wurden. Einem enzymatischen Verdau in Falcon-Röhrchen mithilfe von 0.2 ml Papain-Lösung für 20 Minuten im 37°C warmen Schüttelwasserbad (Gesellschaft für Labortechnik GFL, 1083, Burgwedel, Deutschland) folgte die Gabe von 200 µl Inaktivierungs-Lösung für weitere 4 Minuten bei 37°C. Zur mechanischen Lösung des Zellverbundes der zuvor eingerissenen Kapsel wurde im Anschluss vorsichtig mit einer 200 µl-Pipette mehrfach trituriert bis sich das Bild einer homogen trüben Lösung zeigte. Diese konnte tropfenweise auf Ethanol gereinigte 25 mm Glasdeckgläsern (Assistent, Germany, No.1001/0025) titriert werden, auf denen die Zellen der Suspension im Inkubator bei 37.5°C und 8% CO₂ 30 Minuten Zeit hatten sich abzusetzen. Für eine ausreichende Zelldichte wurden Zellsuspensionen von 2 Nebennieren derselben Maus auf jeweils ein Glasdeckgläschen gegeben. Danach wurden 3 ml Kulturmedium für Chromaffinzellen in die Kammern der Kulturplatte, in der sich die Deckgläser befanden, gegeben, inkubiert und während der folgenden 3 Tage zu elektrophysiologischen Experimenten verwendet.

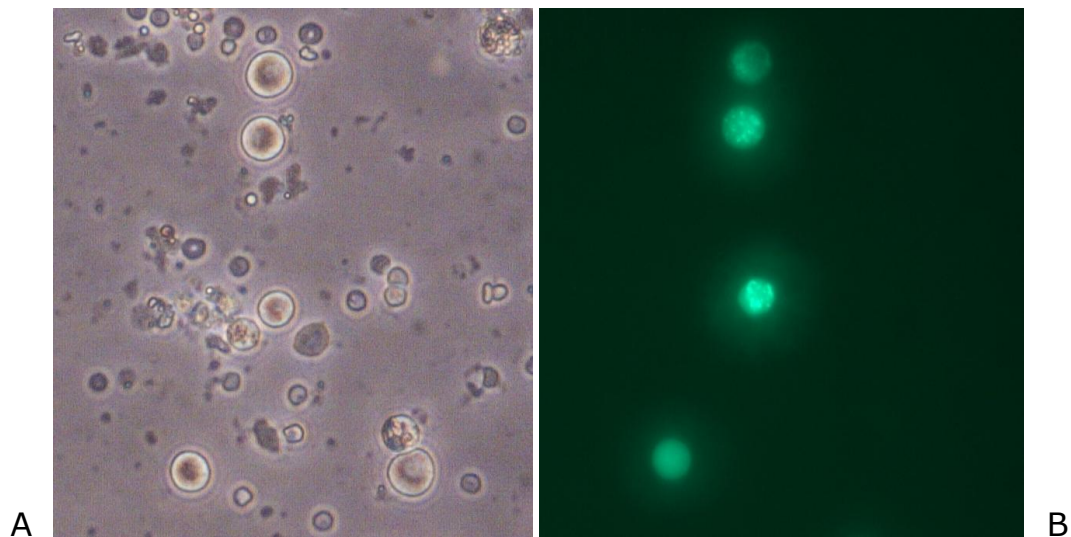


Abb. 7 A: Phasenkontrastmikroskopisches Bild von Wildtyp-Chromaffinzellen in Kultur. Nach Auflösung des Zellverbunds zeigen kultivierte Chromaffinzellen eine nahezu kugelförmige Oberfläche.

Abb. 7 B: Phasenkontrastmikroskopisches Bild von infizierten Chromaffinzellen in Kultur. Anhand der grünen Fluoreszenz können mit SF-Virus infizierte Zellen identifiziert werden (siehe auch 2.2.1.2.).

2.2.2.2. Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Hierzu wurden distale Enden der Mäuseschwänze abgetrennt und zunächst bei -20°C eingefroren. Die verwendeten Detergenzien wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen.

2.2.2.2.1. Präparation der genomischen DNA

Zur Präparation der genomischen DNA wurde das „DirectPCR Tail“-Kit der Firma Viagen (Katalognummer T102) verwendet. 400 µl Lösungspuffer wurden zum Mäuseschwanzspitzengewebe (2mm) hinzugefügt und mit 6 µl Proteinkinase K (Fa. Sigma, P4850) versetzt. Es erfolgte die Anverdauung für 90-120 Minuten bei 56°C im Schüttelbad. Im Anschluss wurde die Probe für 45 Minuten bei 85°C erhitzt, für 3 Minuten bei 13000 U/min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und 350 µl Überstand verworfen. Nach Ausfällung mit 350 µl Isopropanol, Waschen mit 500 µl 70%vol.-Ethanol und Trocknung an der Luft wurden nach Resuspension mit 50 µl Puffer EB 4 µl der fertig gestellten DNA für die PCR auf Eis bei +4°C bereit gestellt.

2.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR erfolgte in Thermozyklern der Firma Eppendorf (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Modell Mastercycler). *Primer* wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Nils Brose (Fritz Benseler, Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen) bezogen. Zum gekühlten DNA-Mastermix wurden 21 μ l Reaktionslösung (Tab. 4) hinzugegeben. Die verwendeten Primer sind in Tab. 3 aufgeführt; als Polymerase wurde Taq verwendet. Die Amplifikation erfolgte nach u.a. Protokoll (Tab. 5).

NEO 395 (3' -> 5')

ACG AGA CTA GTG AGA CGT GCT (1020)

SNAPIN 11550 (5' -> 3')

CAC TTA GAT GGC TCA GCG GTT (754)

Tab. 3: Primer für die Genotypisierung.

Menge (μ l)	Detergenz (Konzentration)
2,5	PCR Puffer (10x)
10,5	dH ₂ O
4	dNTP mix (2.5 mM)
1,5	MgCl ₂ (25mM)
1	11550 (5') (10 μ M)
1	neo395 (3') (10 μ M)
0,5	Taq DNA Polymerase (5U/ μ l)

Tab. 4: PCR-Reaktionslösung.

Es entstehen pro PCR-Röhrchen 21 μ l Reaktionslösung.

Temperatur (°C)	Zeit (min.)	Zyklen
95	5	1
95	0,5	40
58	1	1
72	10	1
4	00	

Tab. 5: Thermozyklisches Temperaturprotokoll.

2.2.2.2.3. Gel-Elektrophorese

Bei der zu erwartenden DNA-Fragmentgröße wurde ein 1%iger Ansatz für ein Agarosegel gewählt. Nach kurzem Aufkochen von Agarose erfolgt die Hinzugabe von 1,5 μ l Ethydiumbromid pro 30 ml zu einer Konzentration von 0,05 μ l/ml ab einer Temperatur von 50°C. Die Aushärtung des Gels erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Firma Peqlab, Erlangen), die im Anschluss mit TAE-Puffer gefüllt wurde und mit den DNA-Fragmenten aus der PCR bestückt wurde. Die Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 80 V über 60 Minuten.

Ein Vergleich mit Fragmenten von definierter Länge aus einer mitlaufenden Standardlösung erlaubt den Rückschluss auf die zu untersuchende DNA-Fragmentlänge. Aufgrund einer Interkalation von im Agarosegel enthaltenem Ethydiumbromid in die DNA fluoreszieren die Produkte unter UV-Licht und werden somit als Banden visualisiert. Somit konnte eine Zuordnung der Genotypen der Mäuse je nach Fragmentläng erfolgen und mittels *phase advanced imaging system* (Phase, Lübeck) dokumentiert werden.

2.2.3. Elektrophysiologie

Ein großer Anteil der dargestellten Ergebnisse beruht auf der *Patch clamp*-Technik, mithilfe derer elektrische Eigenschaften an biologischen Zellmembranen beschrieben werden können (Sakmann and Neher, 1995).

Nachdem die extrazelluläre *Patch clamp*-Methode zunächst zur Vermessung von einzelnen Ionenkanälen herangezogen wurde (Hamill et al., 1981), konnte die Technik als Basis für Weiterentwicklungen eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten zur Charakterisierung von elektrischen Ereignissen an biologischen Membranen hervorbringen. Eine dieser Techniken, die Membrankapazitätsmessung nach Lindau und Neher wurde in dieser Arbeit verwendet (Lindau, 1991; Lindau and Neher, 1988).

2.2.3.1. *Patch clamp*-Technik

Das Messprinzip der *Patch clamp*-Technik beruht auf einem *Voltage clamp*-Verfahren mit sehr hoher Auflösung von Zeit und Amplitude: In einem elektrischen Schaltkreis wird ein Kompensationsstrom erzeugt (und gemessen), der zum Ausgleich in eine *gepatchte* Zelle gegeben wird, wenn eine Differenz zwischen der definierten Sollspannung und der gemessenen Membranspannung detektiert wird (Abb. 8). Über diesen Kompensationsstrom können Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit der Zellmembran (Ionenkanäle, Ionenpumpen) gemacht werden. Der elektrische Schaltkreis stellt also letzten Endes einen Schaltkreis mit Strom-Spannungs-Wandler dar.

Experimentelle Vorgehensweise ist ein vorsichtiges Annähern einer gläsernen Mikropipette (die mit dem Vorverstärker verbunden ist) an eine Zelloberfläche bis es zum Kontakt mit der Zellmembran kommt. Nach Ablassen eines geringen, positiven Drucks in der *Patch*-Pipette, der eine Durchmischung der Kulturlösung mit der Intrazellulär-Lösung verhindert, wird ein kleiner Teil (*Patch*) in die Mündung der Pipette hineingesaugt, was an einer Erhöhung des Serienwiderstands zu sehen ist. Da nun die Pipette sehr fest mit der Zellmembran verbunden ist, findet sich auch ein sehr großer Abdichtungswiderstand, der sich im Gigaohm-Bereich befindet („*Gigaseal*“). Der kleine *Patch* ist nun elektrisch nicht nur sehr gut isoliert, es reduziert ein Hintergrundrauschen auch sehr effektiv. Von dieser

Ausgangskonfiguration, der *Cell attached*- oder *On cell*-Konfiguration, sind viele weitere möglich. In der aktuellen Arbeit wurde die *Whole cell*-Konfiguration verwendet als Basis für Membrankapazitätsmessungen (2.2.3.4.).

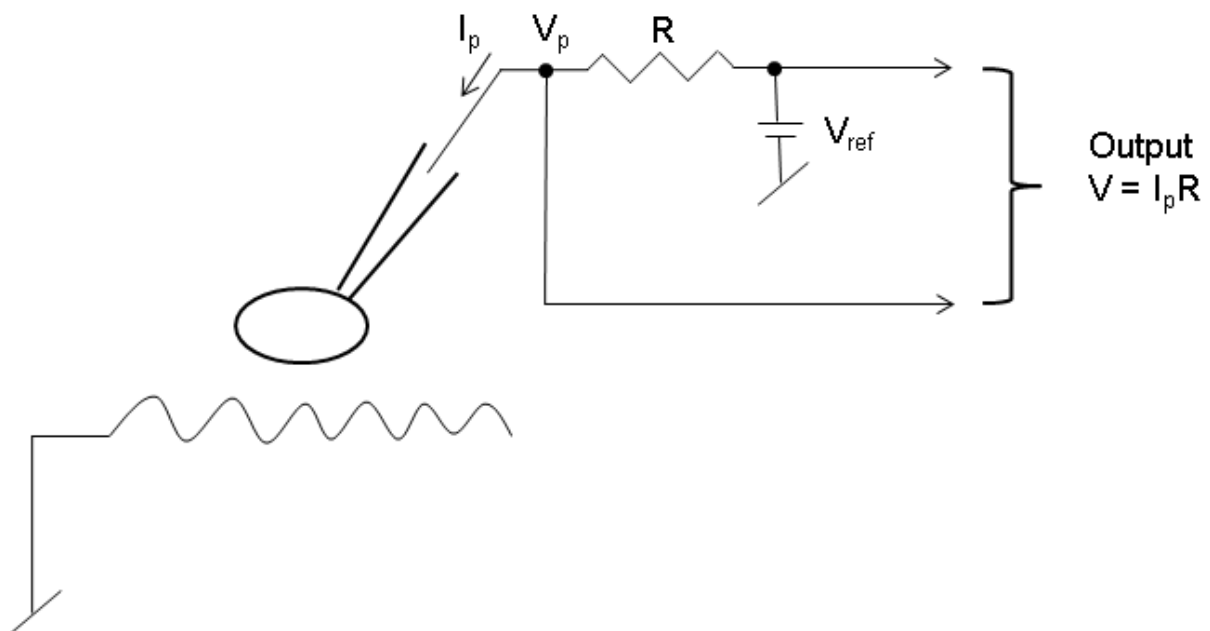


Abb. 8: Ersatzschaltkreis einer „gepatchten“ Zelle
Das in der Pipette gemessene Potenzial entspricht annähernd V_{ref} .
(modifiziert nach Sakmann and Neher, 1995)

2.2.3.2. Patch clamp-Messplatz

Die invasiven Messungen an lebenden Zellen erfordert höchste räumliche Präzision wie auch Freiheit von elektrischen Störfeldern. Zur elektrischen Abschirmung wurde das invertierte Mikroskop (Olympus ix70-S8F, Olympus optical Co. Ltd, Japan) in einem Faraday-Käfig (Eigenbau) auf einem zur Reduktion von Schwingungen luftgefedertem Tisch (Newport, Irvine, California, USA) fest installiert. In eine Messkammer mit Flüssigkeitsüberlaufschutz, die auf Verschiebetischen Mobilität in allen 3 Raumachsen hatten, konnten die Glasdeckgläser (mit darauf kultivierten Chromaffinzellen) gelegt werden. Mikrometergenaue Zielmotorik der *Patch*-Pipetten konnte über die Kombination eines Makromanipulators (klappbar und durch Schrauben zu bewegen, Eigenbau) in Kombination mit einem Mikromanipulator (Pachman NP2, Eppendorf AG, Hamburg) erzielt werden. An diesen war auch der Pipettenhalter samt Vorverstärker montiert, in den als Messelektrode ein Silberchlorid-Draht eingespannt war.

2.2.3.3. Herstellung der *Patch*-Pipetten

Patch-Mikropipetten wurden aus Glasröhrchen mit Filament (GC150F-8P, Science Products, Hofheim, Germany) in einem vertikalen Zuginstrument („*puller*“, PA-10, TSE-Systems, Technical and Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg, Germany) selbst hergestellt und poliert (MF-200, World Precision instruments Inc., Sarasota, FL, USA). Die Größe der Kontaktöffnung zur Zelle entsprach einem elektrischen Widerstand von 3 bis 5 M Ω in den unter 2.1.1. genannten Lösungen.

2.2.3.4. Membrankapazitätsmessungen

Nachdem zunächst Membranleitfähigkeit bzw. Ionenkanäle (2.2.3.1.) vermessen wurden, folgten rasch Techniken zur Charakterisierung von anderen passiven elektrischen Zellparametern u.a. der Membrankapazität (Neher and Marty, 1982).

Ein aus der Elektrotechnik bekanntes passives, elektrisches Bauelement ist der Kondensator, dessen elektrische Eigenschaften mit denjenigen einer Plasmamembran einer Zelle vergleichbar sind: Sie haben beide die Fähigkeit elektrische Energie (in Form von elektrischen Ladungsträgern) zu speichern, was als elektrische Kapazität bezeichnet wird. Die spezifische Kapazität von Zellmembranen beträgt etwa 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ und ist ein Maß für die Größe einer Zelloberfläche (Fenwick et al., 1982). Bei vesikulären Exozytoseprozessen inkorporiert sich die Vesikelmembran in die Zellmembran, sodass eine Vergrößerung der Zelloberfläche zu sehen ist. Ein umgekehrter Effekt, also eine Verkleinerung der Zellmembran findet sich bei Endozytoseprozessen (Neher, 1992b, 1998). Da sich Zelloberfläche und Kapazität konsensuell verändern, kann die gemessene Kapazität als kumulatives Maß für Exo- und Endozytose herangezogen werden (He et al., 2009).

Ausgehend von der *On cell*-Konfiguration (2.2.3.1) wurde nun der Berührungspunkt der Mikropipettenöffnung durch Ansaugen zum Zellinneren hin durchbrochen. Diese Konfiguration wird *Whole cell*-Konfiguration genannt und erlaubt nicht nur das Messen der elektrischen Kapazität: weiterhin kann das intrazelluläre Milieu hinsichtlich der ionischen Zusammensetzung kontrolliert wie auch durch Applikation von Detergenzien beeinflusst werden (Marty and Neher, 1995). Da allerdings der Austausch via Diffusion kein unidirektionales Phänomen ist, können über die Zeit eines Experiments einer Kapazitätsmessung Ionenkanäle unbeabsichtigt auf

unphysiologische Weise beeinflusst werden (*Wash out*-Phänomen) (Neher, 1992a). Aus diesem Grund wurden Exocytose beeinflussende als auch für die Exocytose essentielle Faktoren wie die intrazelluläre Kalziumkonzentration, ATP und GTP in der Intrazellular-Lösung (2.1.1.) berücksichtigt.

Die zeitlich hochauflösenden Kapazitätsmessungen wurden in der Lindau Neher-Technik durchgeführt (Lindau, 1991; Lindau and Neher, 1988). Chromaffinzellen wurden in der *Whole cell*-Konfiguration ausgehend von einem Haltepotenzial von -70 mV mit einer Sinuswelle mit 1000 Hz ausgesetzt. Aus der Verzögerung zwischen Spannungs- und Stromsignal lässt sich direkt die Membrankapazität, Membranleitfähigkeit und der Zugangswiderstand herleiten. Daten wurden bei Raumtemperatur mit einem EPC-9 Verstärker (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) aufgenommen und mit der PULSE-Software über die „Lock-in“ Softwareerweiterung (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) prozessiert. Die generierten Daten wurden in IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) exportiert.

Von der Analyse wurden solche Zellen ausgenommen, die einen Zugangswiderstand von kleiner 5 M Ω bzw. größer 20 M Ω , eine initiale Zellgröße von kleiner 4 pF oder größer 11 pF, eine basale initiale intrazelluläre Kalziumkonzentration von größer 500 nM oder während der Dialyseperiode Größenzu- bzw. -abnahme von mehr als 10% der Ausgangsgröße aufwiesen.

2.2.3.5. Intrazelluläre Kalziumkontrolle

Da es sich bei den hier durchgeführten Experimenten um stark kalziumabhängige Exozytoseprozesse (*Priming* und *Fusion*) handelt (Voets, 2000), ist eine genaue Kenntnis der intrazellulären Kalziumkonzentration unabdingbar.

2.2.3.5.1. Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Hierzu wurde ein photometrisches Verfahren *in vivo* angewendet, bei dem der Effekt von Ca²⁺-Indikatoren ausgenutzt wurde, eine Änderung der Emissionsintensität bei Exzitation aufgrund von Ca²⁺-Bindung mit konsekutiver Absorptionsverschiebung zu messen (Simpson, 1999). Um die volle Konzentrationsbreite intrazellulären Kalziums dieser Experimente abbilden zu können, wurde die Kombination von zwei Ca²⁺-

Indikatoren notwendig: Fura-4F deckt hierbei den nanomolaren Konzentrationsbereich, in dem das *priming* (ab etwa 500 nM) am effektivsten ist, ab; Mag-Fura-2 den mikromolaren, den die Fusion (>10 μ M) benötigt.

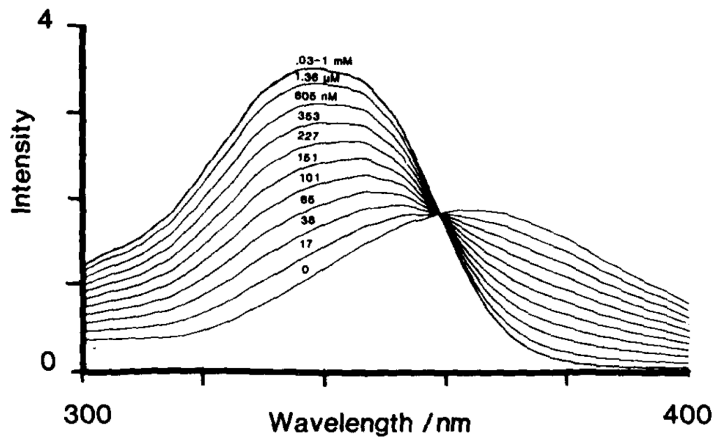


Abb. 9: Exzitationsspektrum für fura-2. 1 μ M fura-2 bei 20°C in Puffern mit freiem Ca^{2+} in Konzentrationen zwischen <1nM bis >10 μ M, Emission bei 510 nm. (Grynkiewicz et al., 1985)

Von der technischen Seite war hierzu am Messplatz ein Monochromator (Polychrom V, TILL Photonics, Planegg, Deutschland) montiert, über den die Indikatoren bei 350 nm und 380 nm angeregt wurden. Die Lichterfassung erfolgte auf einer Photodiode (TILL Photonics, Planegg, Deutschland), die einen „Photo-Strom“ in ein „Spannungs-Signal“ konvertiert. Die erhobenen Daten wurden über die FDU-2 (*Fluorescence Detection Unit*, TILL Photonics, Planegg, Deutschland) prozessiert und konnten dann mit der PULSE-Software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) verarbeitet werden. Die kalkulierte Kalziumkonzentration wurde dabei nach Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985) folgendermaßen berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_{\text{eff}} \times R_1 \frac{R - R_{\text{min}}}{R_{\text{max}} - R}$$

R beschreibt das Verhältnis der Emissionsintensität (bei 350/380 nm) bei bekannter intrazellulärer Kalziumkonzentrationen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. R_{min} , R_{max} und K_{eff} sind jeweils Konstanten, die über Kalibrierung gewonnen werden, wobei R_{min} in kalziumfreier Lösung und R_{max} in einer den Indikator sättigenden Lösung gemessen wird. Das Verhältnis von K_{eff} und K_D wird durch Zhou und Neher beschrieben (Zhou and Neher, 1993). K_D beschreibt die Dissoziationskonstante von Kalzium am Kalziumindikator.

Sie ist wichtig zur Abschätzung der Kalzium-Pufferkapazität des Indikators. Eine Kalziumkalibrierung wurde wie bei Voets et al. durchgeführt (Voets, 2000). Dabei werden *Patch*-Pipetten mit Lösungen bekannter Kalziumkonzentration gefüllt und in Chromaffinzellen dialysiert. Ermittelte Fluoreszenzwerte (Verhältnis 380 nm zu 350 nm) logarithmisch aufgetragen ergeben eine Funktion, die sich folgendermaßen darstellen lässt:

$$R = R_0 - R_1 \frac{[Ca^{2+}]}{[Ca^{2+}] + K_1} - R_2 \frac{[Ca^{2+}]}{[Ca^{2+}] + K_2}$$

R_0 zeigt hierbei R bei einer intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i = 0$ an mit 40 mM BAPTA ohne $CaCl_2$, $(R_0 - R_1 - R_2)$ entspricht dem Verhältnis, das bei einer Kalziumkonzentration von 10 mM $CaCl_2$ entspricht.

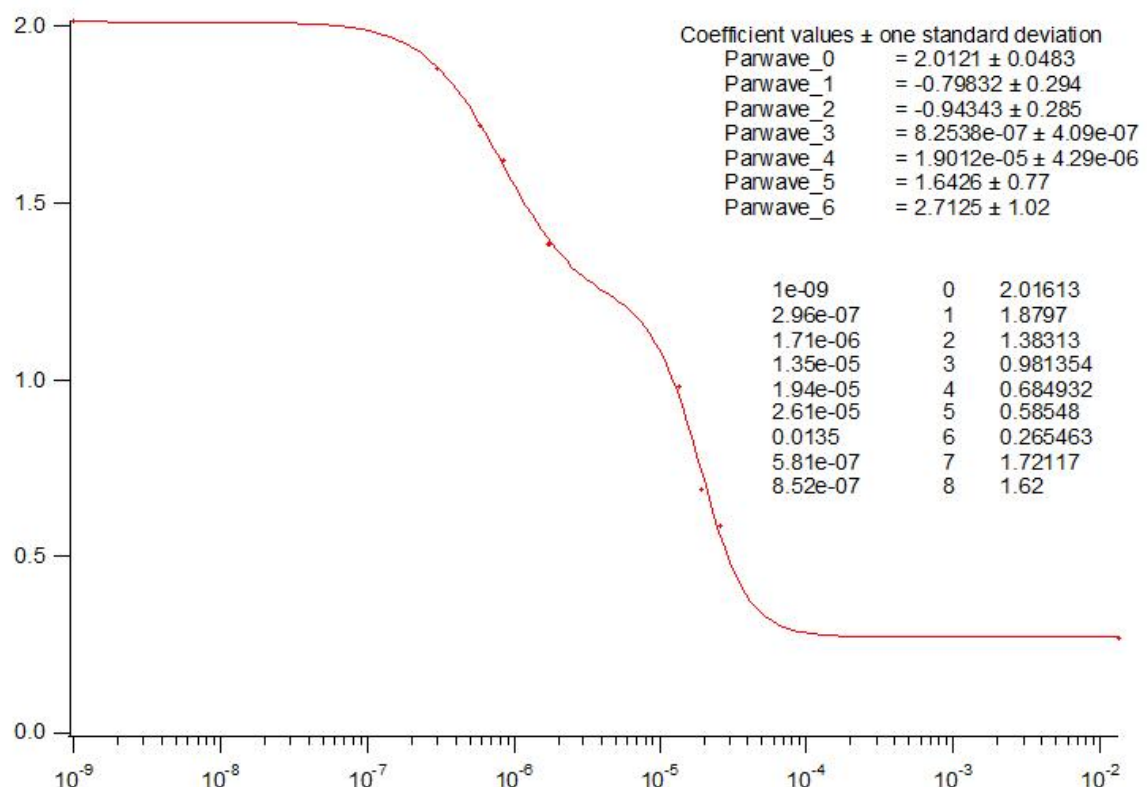


Abb. 10: Kalziumkalibrierung *in vitro*.

Funktion des Verhältnisses der Emissionsintensität bei Illumination mit 350/380 nm (X-Achse) über die intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$ in Mol) (Y-Achse).

Die photometrische Detektion des Verhältnisses 350/380 nm ermöglicht die Berechnung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Die gemessenen Datenpunkte repräsentieren das Emissionsverhältnis (350/380nm) bei bekannten Kalziumkonzentrationen. Zusammenarbeit mit Dr. Ulf Matti.

2.2.3.5.2. Kalzium-Photolyse

Problematisch ist, dass unter physiologischen Umständen die Distribution von Kalzium in der Zelle nicht homogen ist. Einem Öffnen von Kalziumkanälen einer Zelle folgt eine komplizierte räumliche Verteilung des Kalziums. Entsprechend trägt zusätzlich nicht nur die inhomogene Verteilung von Kalziumkanälen (z.B. in sog. Mikrodomänen in Nervenenden bei Neuronen) zu dieser inhomogenen Distribution von Kalzium bei (Neher, 1998), ebenso gehen im Rahmen von Zellisoliationsprozessen Kalziumkanäle verloren. Zudem finden sich in Chromaffinzellen eine gewisse Regionalisierung mit Ausbildung von Kalzium-„hot spots“ (Mansvelder and Kits, 2000).

NP-EGTA (*o*-nitrophenyl EGTA) ist ein photolabiles Molekül, das als Kalziumchelator fungiert. Eine hohe Kalziumbindungsaffinität ($K_d=80$ nM) weicht nach Zerfall, hervorgerufen durch einen Photoimpuls einer Xenonbogenlampe (T.I.L.L. Photonics, Planegg, Germany), einer niedrigen Kalziumbindungsaffinität ($K_d=1$ mM), die mit einer Kalziumfreisetzung einhergeht (Abb. 11). Die Distribution von freiem Kalzium nach Photolyse erscheint im Lichtmikroskop homogen (Naraghi et al., 1998). Somit kann nicht nur das Problem der inhomogenen Verteilung von Kalzium (Kalzium-Mikrodomänen) quasi umgangen werden, zeitgleich umgeht man durch Kalzium-Photolyse modulatorische Effekte (z.B. auf elektrische Erregbarkeit und Kalzium-Influx), die durch elektrische Erregung wie bei Depolarisationsexperimenten hervorgerufen werden. Darüber hinaus hat man ein effektives Tool zur Manipulation der intrazellulären Kalziumkonzentration mit millisekundengenauer Steuerung (Ellis-Davies et al., 1996; Neher, 2006).

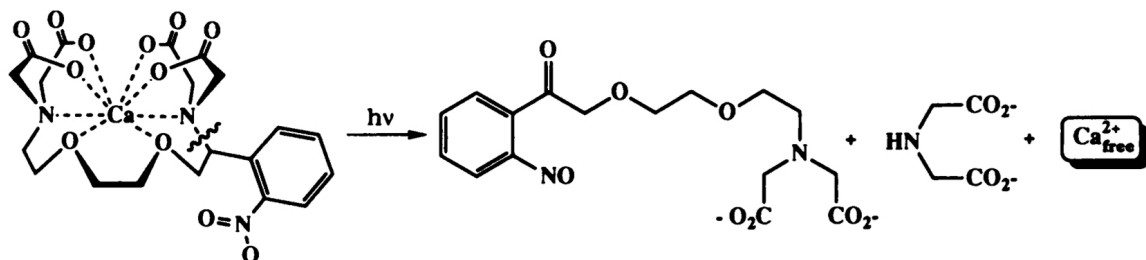


Abb. 11: Photolyse von gebundenem Kalzium von NP-EGTA. Die Photolyseprodukte haben eine 12500-fach niedrigere Affinität zu Kalzium als der ursprüngliche Kalziumchelatorkomplexe. (Ellis-Davies and Kaplan, 1994)

Als Bestandteil der Intrazellulär-Lösung (Tab. 2) gelangte NP-EGTA in der *Whole cell*-Konfiguration in das Zellinnere und konnte sich dort homogen verteilen. Diesen Zeitabschnitt von bis zu 2 Minuten nach Erreichen der *Whole cell*-Konfiguration nennt man Dialyseperiode. Vor der eigentlichen Kalzium-Photolyse konnte die intrazelluläre Kalziumkonzentration mithilfe des Monochromators durch Photolyse kleinerer Mengen von NP-EGTA streng im Bereich zwischen 300 nM und 500 nM eingestellt werden.

Die eigentliche Photolyse erfolgte durch einen gefilterten (UV-Filter UV-3, FT 400, AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland) Lichtimpuls (UV-Blitzlichtlampe, Rapp Optoelektronik, Hamburg, Deutschland) und konnte als stufenförmiger Anstieg der Kalziumkonzentrationen gemessen werden (wie in 2.2.3.5.). Die im mikromolaren Bereich erzielten und relativ hohen Kalziumkonzentrationen haben eine komplette Depletion fusionskompetenter Vesikel zur Folge (Voets, 2000) und ermöglichen somit die detaillierte Aufspaltung der Freisetzungskinetiken einzelner exozytotischer Phasen.

Kapazitätsmessungen wurden zeitgleich wie in 2.2.3.4. beschrieben durchgeführt.

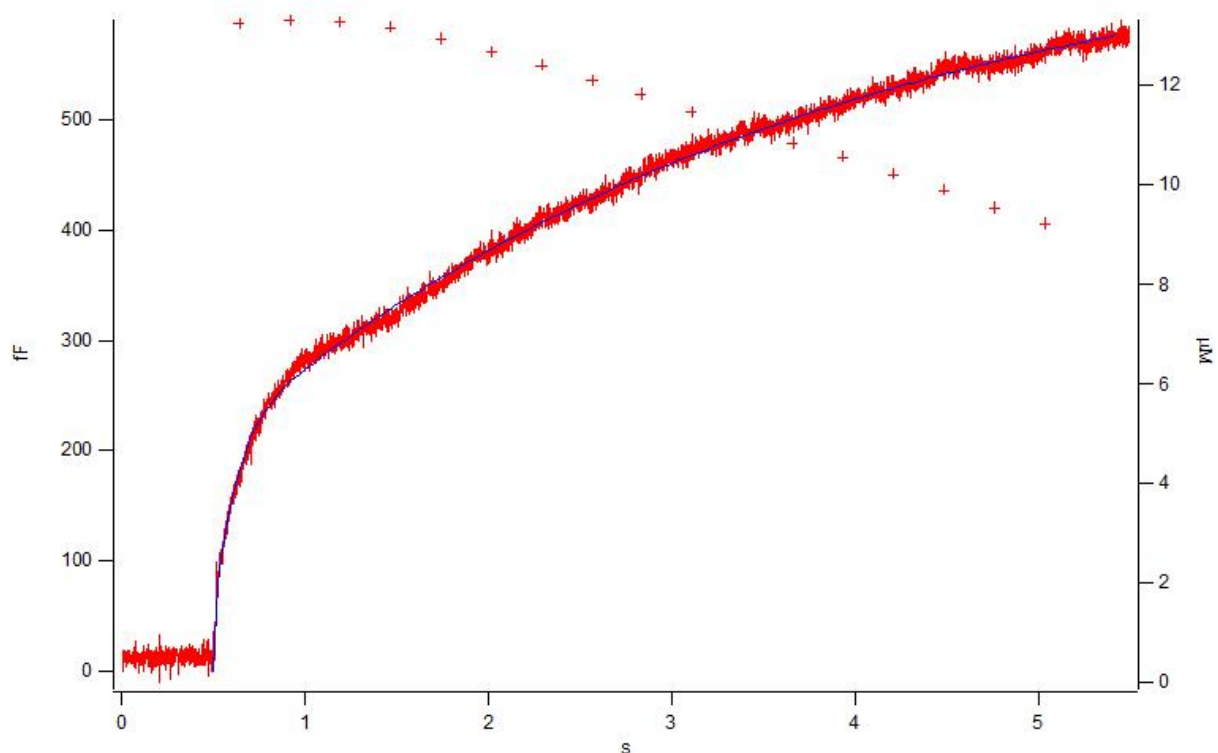


Abb. 12: Membrankapazitätszuwachs nach plötzlichem Kalziumanstieg. Einem Kalziumanstieg von $0,3 \mu\text{M}$ auf $>10 \mu\text{M}$ (rote Kreuze) durch Blitzlichtphotolyse folgt durch Depletion der fusionskompetenten Vesikel und deren Verschmelzung mit der Plasmamembran eine Membrankapazitätszunahme, hier bei einer Chromaffinzelle des Snapin-Wildtyps.

Als Grundlage für die Parameterabschätzung (*curve fitting*) lässt sich näherungsweise dieser Anstieg mit einer Exponentialgleichung wie folgt beschreiben:

$$f(x) = A_0 + A_1 \left(1 - e^{\frac{-(t-t_0)}{\tau_1}} \right) + A_2 \left(1 - e^{\frac{-(t-t_0)}{\tau_2}} \right) + A_3 \left(1 - e^{\frac{-(t-t_0)}{\tau_3}} \right)$$

Hierin kommen die unterschiedlichen *pools* mit unterschiedlichen Fusionskinetiken zum Ausdruck: Nach A_0 als Ausgangskapazität der Zelle zeigen die Parameter A_1 und τ_1 bzw. A_2 und τ_2 die Amplituden (= Poolgrößen) und Zeitkonstanten (= Fusionskinetiken) des RRP und des SRP an. Die Kapazitätsänderung zwischen $t = 0$ Sekunden und $t = 1,0$ Sekunden wurde definiert als initialer „burst“, A_3 und τ_3 entsprechen Amplituden und Zeitkonstanten im Zeitintervall zwischen $t = 1,0$ Sekunden und $t = 5$ Sekunden, die die verzögerte Freisetzungskomponente zeigt.

Ausschlusskriterien zur weiteren Analyse für die photometrisch erhobenen Daten nach Kalzium-Photolyse waren eine intrazelluläre Kalziumkonzentration von kleiner $8 \mu\text{M}$ oder größer $30 \mu\text{M}$ sowie eine „schnelle Endozytose“, vor Kalzium-Photolyse kleiner 300 nM oder größer 500 nM .

2.2.3.6. Amperometrie

Die Amperometrie-Messung macht sich das elektrochemische Phänomen zunutze, dass transiente Ströme von oxidierbaren Substanzen wie biogenen Katecholaminen mithilfe von Karbonmikrofasern detektiert werden können (Gonon et al., 1993; Neher, 1998).

Hierbei zeigen nach Anlage einer sich über dem Redoxpotenzial befindlichen Haltespannung transiente Ströme, die in der aktuellen Arbeit gemessen wurden, bzw. unterschiedliche Katecholamine spezifische zyklische voltametrische Antworten (Leszczyszyn et al., 1991). Leszczyszyn und Kollegen haben eine Technik entwickelt, mithilfe derer Katecholaminsekretion von einzelnen Chromaffinzellen gemessen werden kann. Für Adrenalin und Noradrenalin, also die Katecholamine der Chromaffinzelle, kann mit 800 mV gegenüber einer Silberchlorid-Elektrode eine Haltespannung angebracht werden, die das Redoxpotenzial um ca. 200 mV übersteigt und dadurch die Orthohydroquinon-Reste (-seitenketten) oxidiert (Chow

et al., 1992). Die dadurch freigesetzten Elektronen sind die physikalische Grundlage des zu messenden elektrischen Stroms (Abb. 13).

Somit kann ergänzend zur Kapazitätsmessung mit höchster zeitlicher Auflösung ein direktes chemisches Verfahren zur Vermessung einzelner exozytotischer Ereignisse (elektrochemisch aktiver Moleküle) bewerkstelligt werden.

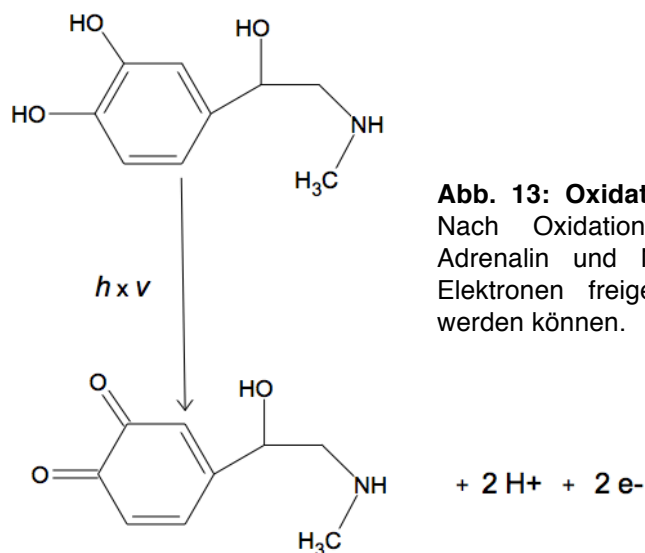


Abb. 13: Oxidation von Katecholamin-Seitenketten. Nach Oxidation der Orthohydrochinon-Reste von Adrenalin und Noradrenalin werden pro Molekül 2 Elektronen freigesetzt, die amperometrisch detektiert werden können.

2.2.3.6.1. Herstellung von Karbonfaser Elektroden

Zur Herstellung von Karbonfaser-Mikroelektroden wird wie durch Bruns (Bruns, 2004) beschrieben vorgegangen: Zunächst wird eine einzelne Karbonfaser (5 μm Durchmesser, ca. 2 cm Länge) mit einem Kupferdraht (ca. 5 cm Länge) mithilfe von elektrisch leitender Karbonklebepaste (Electrodag 5513, Bavaria Elektronik, Rosenheim Germany) verbunden und im Anschluss vorsichtig in eine Borosilikat-Glaskapillare (borosilicate, GC150F-10, Clark Electromedical, England) eingeführt (Abb. 14). Nach Fixierung des freien Endes des Kupferdrahtes in der Glaskapillare durch Zweikomponenten-Epoxidharzkleber wird die Glaspipette im Mikropipettenpuller (PA-10, TSE-Systems, Technical and Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg, Deutschland) derart ausgezogen, dass die Karbonfaser die Pipettenspitze um wenige Millimeter überragt. Zur Isolation der Oberfläche des Karbonfaserüberstandes wird dieser durch kathodische Tauchlackierung behandelt. Hierbei wird in einem Lackbad über eine Platinfolie als Anode eine Gleichstromspannung von 6 Volt für ca. 20 Sekunden angelegt, die bewirkt, dass das

Lackbindemittel an der Karbonfaser als Kathode koagulierte und infolgedessen eine Lackabscheidung des nicht elektrisch leitfähigen Lacks (#2934788; BASF, Deutschland) an der Karbonfaser stattfindet. Derart beschichtet wird das Konstrukt zur Aushärtung in einem Ofen bei 190°C für 20 Minuten erhitzt. Hierdurch kann eine homogen dünne, isolierende Beschichtung von ca. 0.5 – 1 µm Dicke erzielt werden. Um zusätzlich die Verbindungsstelle zwischen Glas und Karbonfaser sicher abzudichten, wurde am Übergang ein Tropfen eines Siliconelastomers (Sylgard, Suter Kunststoffe, Jegenstorf, Schweiz) aufgebracht und erneut mit 50°C gebacken. Vor dem Gebrauch wird mit einem chirurgischen Skalpell die isolierte Spitze der Karbonfaser abgetrennt und somit gegenüber einer amperometrischen Aufnahme eröffnet.

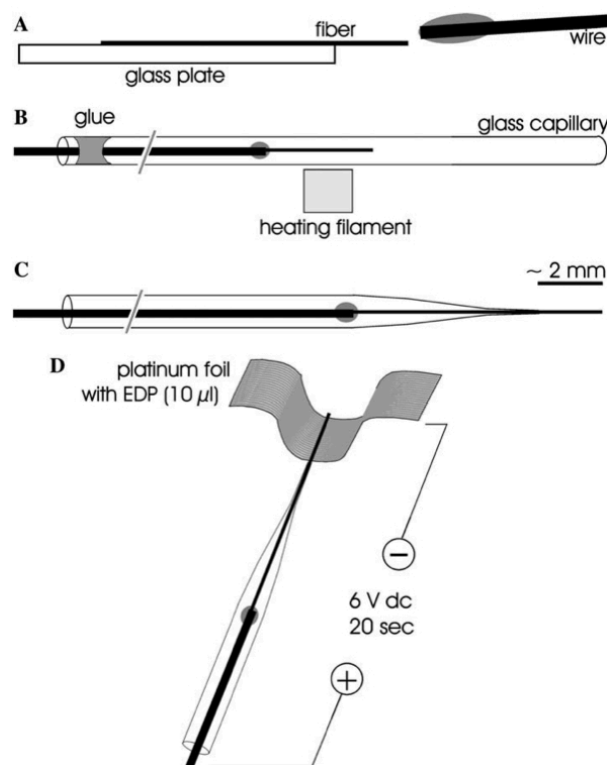


Abb. 14: Schematische Darstellung der Herstellung von durch kathodische Tauchlackierung isolierter Karbonfaser-Mikroelektroden. Aus: (Bruns, 2004)

2.2.3.6.2. Amperometrie-Messung

Eine Karbonfaser-Mikroelektrode wird über den Pipettenhalter am Vorverstärker eines EPC-7 Patch Clamp-Verstärkers (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland)

angebracht und mit dem gleichen Makro- und Mikromanipulationssystem wie in 2.2.3.2. beschrieben der Zielzelle angenähert. Nach Anlage einer sich über dem spezifischen Redoxpotenzial von Katecholaminen befindlichen Haltespannung von 800 mV werden die aus neurosekretorischen Vesikeln freigesetzten biogenen Katecholamine bei Kontakt zur Karbonfaseroberfläche oxidiert (Abb. 15). Ein einzelnes exozytotisches Ereignis lässt sich amperometrisch als Strom mit einem typischen, spitzen Kurvenverlauf messen. Die kumulative Menge an freigesetzten Katecholaminen konnte über das Integral der amperometrisch gemessenen Ströme errechnet werden. Diese wurden der EPC-7-Einheit bei Raumtemperatur erfasst und mit 3 kHz gefiltert (8-Pole Festfrequenz Besselfilter). Die Digitalisierung erfolgte bei 25 kHz. Als Akquisitions- und Steuerungssoftware wurde auf einem IBM Personalcomputer unter Microsoft Windows das Programm pClamp6 (Axon instruments, Foster City, CA, USA) und AutesW (NPI Electronics, Tamm, Deutschland) verwendet.

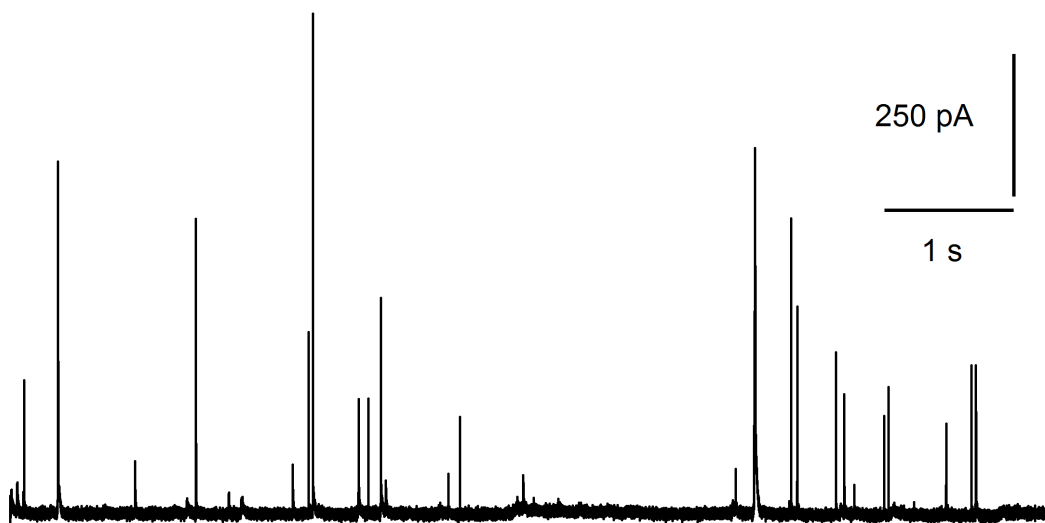


Abb. 15: Amperometrie einer Wildtyp-Chromaffinzelle.
Detektion spontaner Sekretion von Katecholaminen.

2.2.3.7. Kapazitätsmessung bei photolyseinduzierter Kalziumfreisetzung

in Kombination mit Amperometrie

Der experimentelle Aufbau kombiniert die in den Abschnitten 2.2.3.4., 2.2.3.5.1. und in 2.2.3.6.1. beschriebenen Methoden. Somit können Schwächen der einzelnen Methoden umgangen werden: Für die Kapazitätsmessungen sind dies hauptsächlich das Erfassen lediglich der Summe von Exo- und Endozytose, also des Nettoprodukts. Zwar finden sich deutlich schnellere Fusionsraten bei der Exocytose (ca. 248 fF/s) gegenüber der Endozytose (ca. 6 fF/s) bei bovinen Chromaffinzellen (Smith and Neher, 1997), dennoch bleibt eine Fehlerbehaftung im Bereich von 5%.

Die alleinige Anwendung der Amperometrie zeigt dahingehend Schwächen, dass die Detektion von Katecholaminen lediglich in unmittelbarer Nähe der Kohlenstoff-Messelektrode stattfinden kann und somit zu einer gewissen Heterogenität der erfassten Signale führt. Ursächlich hierfür ist, dass die Oxidation der Transmittermoleküle um ein Vielfaches schneller stattfindet als die Diffusion dieser Moleküle zur Elektrode. Folge ist, dass der zu messende Strom eine Funktion des Transmittertransports zur Elektrodenoberfläche ist und somit letztendlich den Diffusionsgradienten beschreibt (Bruns, 2004). Aus diesem Grund ist es wichtig die Elektrode in unmittelbare Nähe ($< 5 \mu\text{m}$) der Zielzelle anzubringen (Schroeder et al., 1992).

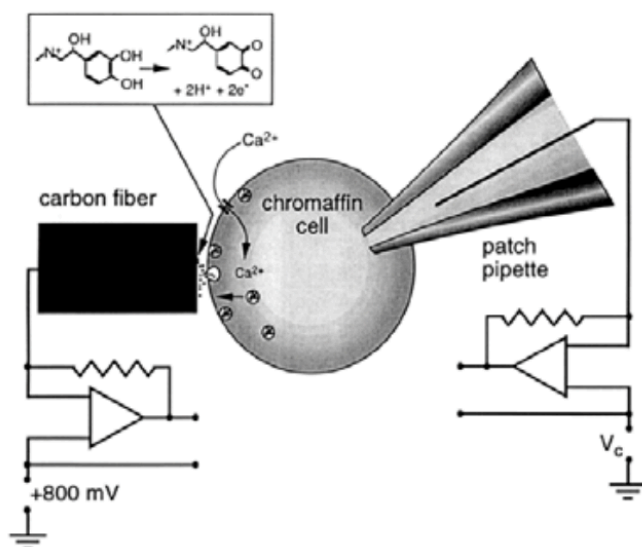


Abb. 16: Simultane Messung von Amperometrie und Kapazität.

Detektion von durch kalziumabhängige Exozytose ausgeschleuste Katecholamine in Verbindung mit Membrankapazitätsmessung an der selben Zelle.

Festzuhalten bleibt, dass aufgrund des komplementären Charakters von

Kapazitätsmessungen und Amperometrie die gleichzeitige Anwendung die Spezifität und Sensitivität exklusiv für Exozytoseprozesse deutlich gesteigert wird, da sowohl eine Aussage zur Vesikelfusion als auch zur Transmitterfreisetzung gemacht werden kann.

Darüber hinaus ergänzt die durch Photolyse bedingte Kalziumfreisetzung diese Methoden um die Möglichkeit einer millisekundengenauen Steuerung der zu beobachtenden Prozesse.

2.2.3.8. Kalziumrampe

Die Kalziumrampen-Experimente wurden in unserem Labor von Dr. Zheng-Xing Wu durchgeführt, die einzelnen Schritte des Experiments sollen aufgrund der Wichtigkeit für die Ergebnisinterpretation trotzdem in Kürze erläutert werden.

Ziel des Rampen-Experiments ist es durch sich langsam verändernde intrazelluläre Kalziumkonzentrationen einzelne Phasen unterschiedlicher Fusionskinetiken nacheinander – und nicht wie bei Blitzlicht-Photolyse-Experimenten gleichzeitig – zu triggern, (Dolensek et al., 2011; Sorensen et al., 2002).

Sorensen et al. haben hierzu eine Methode entwickelt, die unterscheiden kann, ob eine reduzierte Neurosekretion die Folge einer Reduktion der Poolgröße (RRP/SRP) oder einer reduzierten Kalziumsensitivität ist. Hierzu werden steigende intrazelluläre Kalziumkonzentrationen über eine schrittweise und genau gesteuerte Kalzium-Photolyse (wie in 2.2.3.5.2.) bewerkstelligt. Parallel dazu kann durch Kapazitätsmessungen (wie in 2.2.3.4.) diejenige Kalziumkonzentration bestimmt werden, bei der die Exozytose beginnt. Aufgrund des mehrphasischen Charakters der Sekretion können Rückschlüsse auf den schnellen, fusionskompetenten Pool und den langsamen, anhaltenden Pool gezogen werden. Über eine Abschätzung der Poolgröße nach Sorensen (Sorensen et al., 2002) kann durch Subtraktion der Anzahl der fusionierten Vesikel die verbliebene Poolgröße berechnet werden. Nach Division der fusionierten Vesikel durch die verbliebene Poolgröße kann die Sekretionsrate errechnet werden. Die Kalziumabhängigkeit der Sekretion aus unterschiedlichen *pools* (z.B. RRP oder SRP) kann nun durch Plotten der Sekretionsrate gegen die Kalziumkonzentration aufgezeigt werden: Als Zeichen unterschiedlicher Kalziumsensitivitäten zeigte sie dann separierte Kurvenverläufe einzelner exozytotischer Phasen.

2.2.3.9 Datenanalyse

Die statistische Analyse der elektrophysiologischen und photometrischen Untersuchungen erfolgte mit dem Mann-Whitney U Test. Das Signifikanzniveau wird jeweils als p -Wert angegeben. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (*Standard Error of the Mean, S.E.M.*) an.

3. Ergebnisse

Um die physiologische Rolle von Snapin in Exozytoseprozessen zu ergründen wurden bereits der Effekt einer Mikroinjektion des Carboxyl-Endes (incl. SNAP-25 Bindungsdomäne) an präganglionären Neuronen (*presynaptic superior ganglion neurons, SCGNs*) (Ilardi et al., 1999) wie auch Überexpressions-Experimente in Kulturen von Chromaffinzellen (Chheda et al., 2001) und Neuronen (Thakur et al., 2004) durchgeführt.

Um die physiologische Analyse zu vertiefen, haben unsere Kollegen eine *Knockout*-Maus kreiert, die die Basis für mein experimentelles Modell ist. Hierzu möchte ich dieses Modell und die Grundcharakterisierung der Maus kurz vorstellen.

3.1 Generelle Beschreibung des experimentellen Modells

Die *Knockout*-Maus wurde durch klassische homologe Rekombinationstechniken hergestellt. Im Speziellen erfolgte die Inaktivierung des Snapin-Gens durch Ersatz der kodierenden Exons durch eine PGKneo-Gen-Kassette in embryonalen Stammzellen (Abb. 5). Die Identifikation genomischer Veränderungen bei Nachkommen chimärer Tiere („*Germline transmission*“) wurde durch *Southern Blot*-Analyse bewerkstelligt (Abb. 6). Nachkommen heterozygoter Elterntiere kamen nahe der erwarteten Verteilung nach Mendel zur Welt.

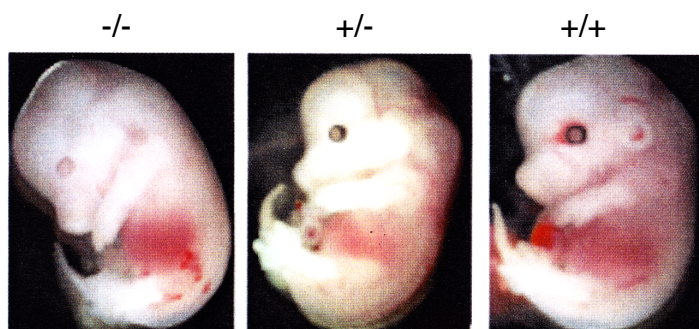


Abb. 17: Phänotypen der Mausembryos im Entwicklungsstadium E18.

Keine wesentlichen phänotypischen Unterschiede bei den Mäusen mit dem Genotyp Wildtyp (+/+), Snapin-*Knockout* (-/-) und den heterozygoten (+/-) Tieren.

Der Phänotyp für die Snapin-Mutation heterozygoter Mäuse zeigt sich in Tieren, die lebensfähig und fertil sind und sich im äußerlichen Erscheinungsbild nicht von ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern unterscheiden. Homozygote Mäuse zeigen einen perinatal letalen Phänotyp, bei dem die Mäuse zwar lebend geboren werden, allerdings innerhalb der ersten Stunden nach der Geburt sterben (Abb. 17). Trotz des letalen Phänotyps der Snapin *Knockout*-Mäuse konnten meine Kollegen um Professor Zu-Hang Sheng in den *National Institutes of Health* in Bethesda, Maryland, USA keine Veränderungen in der Struktur oder Zytoarchitektur von Gehirn oder Nebenniere bis zum mikro- und ultrastrukturellen Level von hippokampalen Synapsen nachweisen. Aufgrund des perinatal letalen Phänotyps ist es notwendig funktionelle Defizite in der Sekretion in einer Primärkultur zu untersuchen. Dazu präparierte ich Chromaffinzellen von genotypisierten Mäusen kurz vor deren Geburt (E18-E19) und verwendete sie für funktionelle Messungen während der folgenden 3 Tage. Wir verpaarten heterozygote Elterntiere, um *Knockout*- und Kontrolltiere aus einem Wurf zu erhalten und diese parallel vermessen zu können.

Als Mittel der Wahl für die Grundcharakterisierung für die Sekretion dient die *Whole cell*-Ableitung der *Patch clamp*-Methode. Sie erlaubt zeitlich hochauflösende und zeitgleiche Messung von Strömen sowie Membrankapazität. Daneben kann das intrazelluläre chemische Milieu durch Pipettendialyse kontrolliert werden, was eine gesteuerte Regulation von intrazellulärem Kalzium ermöglicht (Abb. 16).

Die Haupthypothese für den Beginn dieser Arbeit war, dass Snapin an der Modulation von regulierten Exozytoseprozessen beteiligt ist.

In Chromaffinzellen kann man Vesikelfusion und Katecholaminausschüttung mithilfe von zwei von einander unabhängigen Methoden messen: Die zeitlich hochauflösenden Membrankapazitätsmessungen erfassen hierbei die Vesikelfusionen mit der Plasmamembran, da jede Vesikelfusion mit der Plasmamembran deren Oberfläche vergrößert und somit proportional die Kapazität der Zelle erhöht.

Die Katecholaminfreisetzung wird durch eine elektrochemische Methode, der Amperometrie, detektiert, da die hier gemessenen Ströme proportional zur freigesetzten Katecholaminmenge sind.

Da die hier vermessenen Exozytoseprozesse eine starke Kalziumabhängigkeit

aufweisen, habe ich diese nicht nur kontinuierlich in meinen Experimenten gemessen sondern mir auch dahingehend zunutze gemacht, um sie mithilfe von photochemischen Prozessen zu manipulieren.

Wichtig in all diesen Ansätzen ist es, dass sämtliche Methoden zeitgleich eine hohe zeitliche Auflösung im Millisekunden bereich aufweisen müssen, weil Sekretion ein extrem schneller biologischer Prozess ist.

3.2. Intrazelluläre Kalziumkontrolle

Durch einen plötzlichen und stufenförmigen, homogenem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Blitzlicht-Photolyse von in NP-EGTA gebundenem Kalzium („*caged calcium*“) wurden Exozytoseprozesse aus Katecholamin beladenen Vesikeln („*large dense core vesicles*“, LDCV) getriggert. Die photometrische Vermessung der intrazellulären Kalziumkonzentration erfolgte synchron mit Serien alternierender (und nicht konstanter) Illuminationen zwischen 350 und 380 nm, um eine ihrerseits verursachte weitere Photolyse von Kalzium gering und dennoch die intrazelluläre Kalziumkonzentration möglichst stabil zu halten.

Die photometrisch erhobenen Daten zeigen, dass die intrazellulären Kalziumkonzentrationen sich vor Blitzlicht-Photolyse in beiden Gruppen nicht unterschieden: 486 nM $[Ca^{2+}]_i$ bei Snapin-*Knockout*- versus 489 nM $[Ca^{2+}]_i$ bei Snapin-Wildtypzellen (Abb. 18) und nach photolytischer Freisetzung jeweils in den beabsichtigten mikromolaren Bereich von 15-20 μ M kamen. Auf dem erzielten mikromolaren Level ist von einer vollständigen Depletion fusionskompetenter Vesikel auszugehen. Während die im Folgenden zu messenden *Amplituden* der *burst*-Komponente im wesentlichen von der Ausgangskonzentration vor Blitzlichtphotolyse abhängt, ist die *Geschwindigkeit* der *burst*-Komponente eine Funktion des Kalziumlevels nach Blitzlichtphotolyse (von Ruden and Neher, 1993). Kalziumkonzentrationen von kleiner 300 nM oder größer 500 nM vor bzw. kleiner 8 μ M oder größer 30 μ M nach Kalzium-Photolyse wurden deshalb von der Analyse ausgeschlossen. Somit sind bei gleichen Ausgangskonzentrationen die im Folgenden beobachteten Effekte der Freisetzungskinetiken nicht unterschiedlichen Kalziumeffekten zuzuordnen.

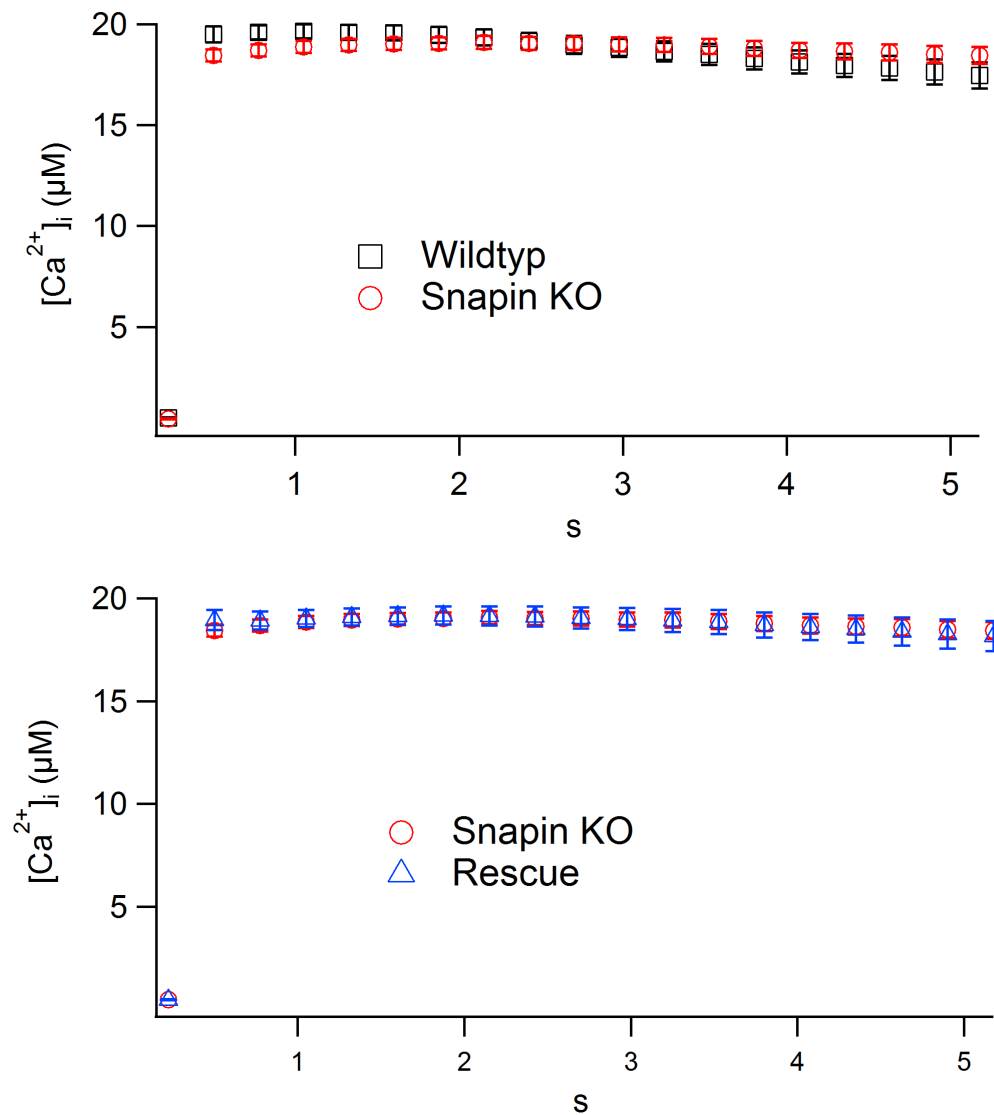


Abb. 18: Photometrische Detektion intrazellulärer Kalziumkonzentrationen.

Sprunghafter Anstieg der Kalziumkonzentration im intrazellulären Milieu vom nano- in den mikromolaren Bereich durch Photolyse gebundenen Kalziums aus NP-EGTA in Snapin *Knockout*-Zellen (rot) im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (schwarz), oben, und in Snapin *Knockout*-Zellen (rot) im Vergleich zu Snapin-*Rescue*-Zellen (blau), unten.

3.3. Kapazitätsmessungen

Bei Chromaffinzellen des Snapin-Wildtyps führte das verwendete Kalzium-Photolyseprotokoll zu einem raschen Anstieg („*burst component*“) der Membrankapazität, dem eine langsame, eher lineare Anstiegskinetik folgte („*sustained component*“). Gemäß dem aktuellen Modell (Rettig and Neher, 2002) entspricht der rasche Anstieg dem *Exocytotic burst* (schneller, fusionskompetenter Pool) und die verzögerte Komponente, die *Sustained component* (langsamer,

anhaltender Pool) der Fusion neu rekrutierter Vesikel nach Depletion der initial fusionskompetenten Vesikel (s.a. Abschnitt 1.4.), (Abb. 19).

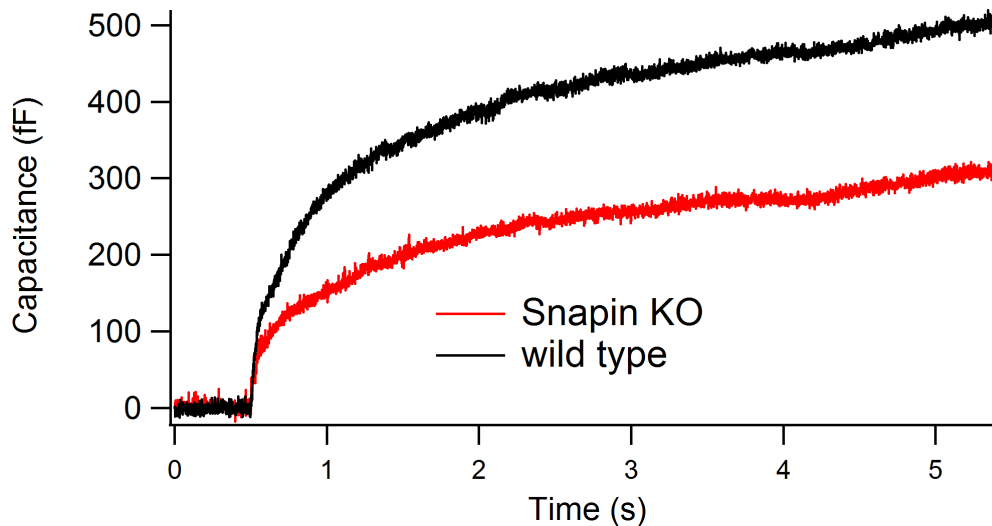


Abb. 19: Einzelne Kapazitätsmessungen an Chromaffinzellen.

Repräsentative Einzelmessungen der Kapazität nach Blitzlichtphotolyse von Kalzium und konsekutiver Größenzunahme von Chromaffinzellen des Snapin-Wildtyps (schwarz) und der Snapin-Nullmutation (rot).

Kapazitätsmessungen an 18 Chromaffinzellen des Snapin-Wildtyp im Entwicklungsstadium E18 zeigen für den initialen *Burst* eine mittlere Größe von 376 fF \pm 60 fF und für die *Sustained component* 305 fF \pm 41 fF, Chromaffinzellen des Snapin-*Knockout* zeigen einen mit etwa 32% ($p < 0,05$; Mann-Whitney-*U*-Test, $n=25$) deutlich reduzierten initialen raschen Anstieg (257 fF \pm 29 fF) mit folgender geringgradig reduzierter linearer Anstiegskinetik (171 fF \pm 24 fF, nicht signifikant), (Abb. 19 und Abb. 20).

Bei der Vermessung weiterer Zellen in unserem elektrophysiologischen Labor durch Dr. Zheng-Xing Wu fällt eine weitere Zunahme des initialen Effekts der Reduktion des *Exocytotic burst* um bis zu ca. 45% (Wildtyp $n=47$; *Knockout* $n=112$; $p=0,0001$; Mann-Whitney-*U*-Test) bei gleichzeitiger verminderter Abnahme der Reduktion der *Sustained component* (kein signifikanter Unterschied) aus (Tian et al., 2005).

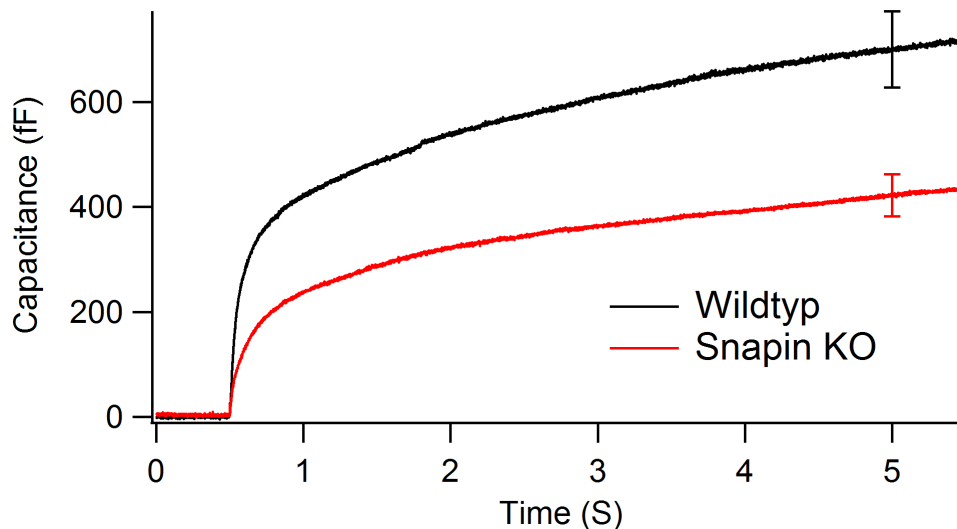


Abb. 20: Kumulative Kapazitätsmessungen an Chromaffinzellen.

Getriggerte Exozytose aus LDCV ist in Snapin-*Knockout*-Zellen (rot, n=25) im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (schwarz, n=18) deutlich reduziert. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M.

Für die statistische Auswertung wurde zur Parameterabschätzung eine Tripel-Exponentialfunktion (s. 2.2.3.5.2) herangezogen, die den Vergleich der einzelnen Freisetzungskinetiken in den drei unterschiedlichen Phasen (RRP, SRP, *Sustained*) ermöglicht. Hierbei fiel aus, dass die Reduktion der totalen Sekretion bei nahezu gleicher *sustained*-Komponente auf Kosten der *burst*-Komponente (RRP + SRP) geschieht. Diese Reduktion in der Exozytose deutet auf einen Effekt im *Priming* hin (Abb. 21).

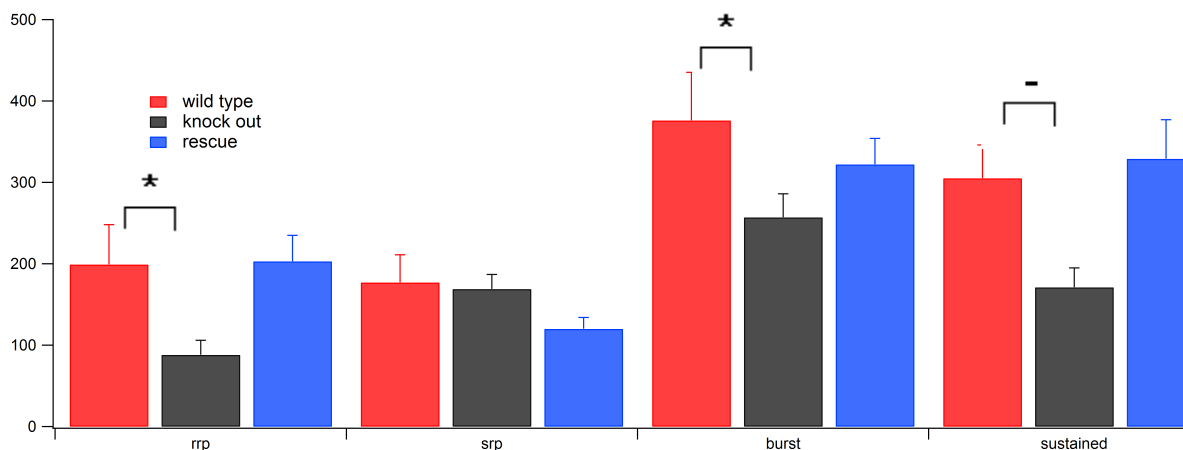


Abb. 21: Größenverteilung unterschiedlicher Pools in Chromaffinzellen von Snapin-Wildtyp, -*Knockout* und -*Rescue*.

Der Snapin-*Knockout* (rot) zeigt eine signifikant verminderte Exozytose im Vergleich zum Snapin-Wildtyp (schwarz). Der Effekt beruht auf einer verminderten *burst*-Komponente. Die verzögerte Komponente der Freisetzung (*sustained*) ist nicht signifikant vermindert. Sternchen (*) markieren die Signifikanz. Poolgröße in fF. Details s. Abschnitt 3.3. und auch Tab. 3.

3.4. Snapin-*Rescue*-Experiment

Die voran gegangenen Experimente wurden an Chromaffinzellen Snapin defizienter Mäuse durchgeführt. Durch genetische Manipulation – wenn auch nur einzelner Proteine – können mitunter vielfältige Prozesse gestört werden, da (auch in dieser Arbeit wichtige) Proteine mitunter mehrere Aufgaben im zellulären Stoffwechsel oder anderen zellulären Prozessen erfüllen (Chen and Scheller, 2001; Feldmann et al., 2003; Jaiswal et al., 2002; Martinez et al., 2000; Mullock et al., 1998; Rao et al., 2004).

Um aufzuzeigen, dass der hier gesehene Effekt einer verminderten Exozytose der Abwesenheit von Snapin zuzuordnen ist, wurde ein *Rescue*-Experiment durchgeführt. Hierbei wird das in *Knockout*-Mäusen depletierte Gen, das für Snapin codiert, über Transfektion wieder zur Expression eingeführt. Ziel dabei ist zu beweisen, dass es sich beim *Knockout* nicht um einen unspezifischen Effekt handelt sondern eine Reversibilität der zuvor gesehen Effekte einstellt.

Hierzu wurde das von Ashery (Ashery et al., 1999) etablierte Überexpressionsmodell mit dem *Semliki Forest Virus* (SFV) für Chromaffinzellen verwendet: Infizierte Zellen (Abb. 7 B) konnten optisch anhand ihrer grünen Fluoreszenz unter Anregung bei 488 nm identifiziert werden, *Knockout*-Zellen dienten als Kontrolle.

Hierbei zeigte sich bei Kapazitätsmessungen an 19 Snapin-*Rescue*-Zellen ein mit 322 fF +/- 32 fF deutlich erhöhter initialer steiler Anstieg („*burst*“) und eine erhöhte totale Sekretion im Vergleich zu *Knockout*-Zellen auf. Der langsame, anhaltende Pool („*sustained component*“) wurde im Mittel mit 328 fF +/- 48 fF gemessen und unterscheidet sich damit nur geringgradig von den *Knockout*-Zellen.

In der statistischen Auswertung zeigt sich nach Ausgleichsrechnung mithilfe der Tripel-Exponentialfunktion (s. 2.2.3.5.2), dass bei den einzelnen Phasen der Sekretion Unterschiede auftauchen: Nach Wiedereinführung des Snapin-Gens ist die *burst*-Komponente signifikant erhöht ($p = < 0,05$; $n = 19$), die verzögerte Komponente zeigt keinen Unterschied auf Signifikanzniveau.

Bezogen auf die Höhe der zuvor bei nativen Snapin-Wildtyp-Zellen gemessenen Werte zeigten die beim *Rescue*-Experiment in ihrer Größe keine signifikanten Unterschiede.

	Snapin- Wildtyp (+/+) n=18	Snapin- <i>Knockout</i> (-/-) n=25	Snapin- <i>Rescue</i> n=19
RRP (fF)	199 +/- 49	88 +/- 18	203 +/- 32
SRP (fF)	177 +/- 34	169 +/- 18	120 +/- 14
<i>Burst</i> (fF)	376 +/- 59	257 +/- 29	322 +/- 32
<i>Sustained</i> (fF)	305 +/- 41	171 +/- 24	329 +/- 48

Tab. 6: Durchschnittliche Größen der einzelnen Sekretionspools.

Somit kann aufgezeigt werden, dass der Effekt des reduzierten *Burst* nach Ausschalten des Snapin-Gens durch Wiedereinführung desselben vollständig aufgehoben werden kann. Diese Reversibilität demonstriert zugleich die Spezifität der untersuchten Prozesse.

Wichtig zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, dass die Ausgangskonzentrationen intrazellulären Kalziums in allen Gruppen auf gleichem Niveau waren und die Ergebnisse somit nicht unspezifischen kalziumabhängigen Effekten zuzuordnen sind (Abb. 18).

3.5. Amperometrie

Da Änderungen im Rahmen einer Membrankapazitätsmessung allerdings nicht spezifisch Exozytose sondern gewissermaßen den Nettobetrag von Exo- und Endozytose aufzeigen, ist eine simultane Detektion von freigesetzten Katecholaminen zur Differenzierung zwischen verminderter Exo- und vermehrter Endozytose wichtig. Durch Verknüpfung der Methoden kann man sich deren komplementären Charakter zunutzen machen, indem das für die Exozytose spezifische Moment der Katecholaminausschüttung durch deren direkte Messung festgehalten werden kann und zeigen, dass man mit Größenveränderungen der Plasmamembran auch überhaupt Exozytose misst. Für einen funktionellen Essay ist die Kombination die derzeit beste Art für die spezifische Messung der hier

untersuchten Prozesse.

Die im folgenden aufgeführten Amperometrie-Daten wurden gemeinsam mit Dr. Zheng-Xing Wu erhoben. Bei Snapin-*Knockout* Zellen konnte gleichsinnig zum verminderten Membrankapazitätszuwachs amperometrisch ein geringerer Strom (I_{AMP}) über die Karbonfaser gemessen werden, sodass von einer verminderten Exozytoseaktivität in Abwesenheit von Snapin ausgegangen werden kann.

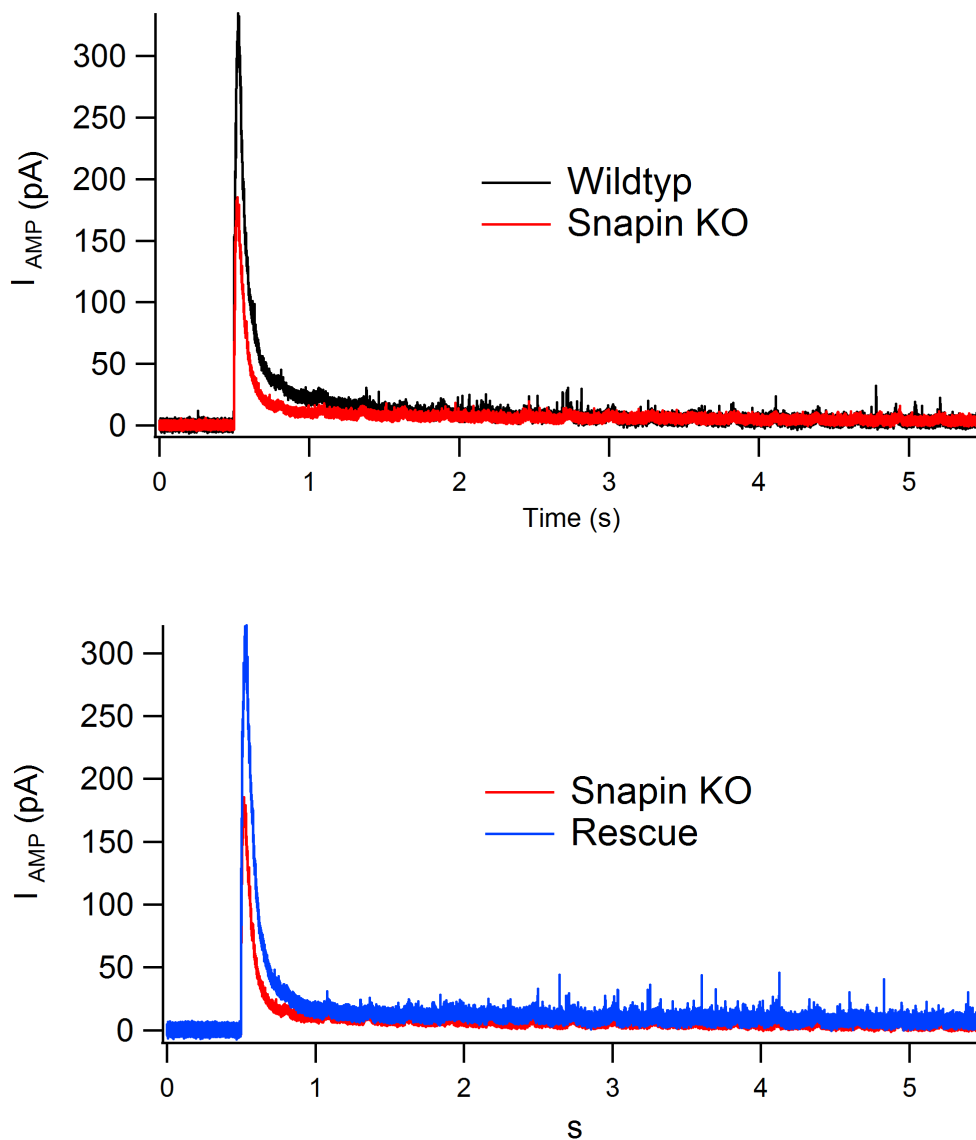


Abb. 22: Amperometrische Detektion oxidierbarer Katecholaminen nach Freisetzung aus LDCV von Chromaffinzellen.

Unmittelbar nach Kalziumphotolyse ($t=0,5$ sek.) zeigt sich ein sprunghafter Anstieg in der Amperometrie Kurve als Zeichen der Freisetzung von Katecholaminen im Rahmen des „*Exocytotic burst*“. Die Ausschleusungskinetik flacht hiernach schnell ab („*Sustained component*“). Der Vergleich zeigt eine deutlich verminderte Freisetzung beim Snapin-*Knockout* (rot) im Vergleich zum Snapin-Wildtyp, oben, und einen nahezu vollständig reversiblen Effekt beim Snapin-*Rescue*.

Analog dazu zeigten sich nach Wiedereinführung des Snapin-Gens im *Rescue*-Experiment, größere amperometrische Ströme (I_{AMP}), als Zeichen vermehrter Katecholmaminfreisetzung (Abb. 22). Ein Defekt der Beladung von einzelnen Vesikeln kann somit auch ausgeschlossen werden. Hierdurch wird zum einen die Reversibilität der untersuchten Prozesse erneut bestätigt und zum anderen die Spezifität der untersuchten Prozesse aufgezeigt.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es die funktionelle Rolle von Snapin an der Neurosekretion zu untersuchen. Hierzu führte ich elektrophysiologische Experimente an Chromaffinzellen genetisch manipulierter Mäuse durch. Die gewonnenen Daten zeigen, dass Snapin einen modulierenden Faktor im komplexen Ablauf der regulierten Exozytose darstellt.

4.1. Funktionelle Untersuchungen

Die durch Membrankapazität erhobenen Daten zeigen eine deutliche Verminderung der gesamten Sekretion von Katecholaminen aus LDCV bei Snapin-*Knockout*-Chromaffinzellen. Auffällig hierbei ist, dass die verbliebene Freisetzung aufzeigt, dass nicht der komplette Exozytoseprozess an sich gestört ist, sondern selektiv der fusionskompetente Pool an Vesikeln um fast die Hälfte reduziert ist. Hieraus resultiert dann auch die absolute Reduktion. Die verzögerte Freisetzung von Vesikeln („*sustained*“) als Anzeige für neu rekrutierte Vesikel aus dem Pool noch nicht maturierter Vesikel („*unprimed pool*“, UPP und „*depot pool*“, DP) ist nicht gestört. Dies deutet auf einen *priming*-Defekt hin.

In den letzten Jahren haben sich in der Analyse von Mutanten von an der Neurosekretion beteiligten Proteinen verschiedenartige Störungen herausgestellt. Eine vollständige Auslöschung exozytotischer Ereignisse findet man bei Mutationen von Bestandteilen des SNARE-Komplex. Diese sind daher als für die Exozytose obligate Proteine definiert. In Chromaffinzellen konnte dies von Sorensen für SNAP-25 und SNAP-23 (Sorensen et al., 2003), von de Wit für Syntaxin (de Wit et al., 2006) und von Borisovska für Synaptobrevin/VAMP (Borisovska et al., 2005) gezeigt werden. Die Ergebnisse der genetischen Experimente sind durch Experimente mit clostridialen Toxinen unterstützt. Diese Toxine sind Proteasen, die als Substrate SNARE-Komplex-Proteine haben. Eine Behandlung mit diesen Toxinen führt ebenso zu einer nahezu vollständigen Auslöschung der Sekretion (Niemann et al., 1994).

Bei Mutanten anderer Proteine findet man eher modulierende Effekte, die sich aber in der Tat im Phänotyp unterscheiden können. In Versuchen an Chromaffinzellen zeigte sich dabei eine im Vergleich eher verminderte Reduktion der Exozytose.

Meine Analyse der Snapin-Nullmutante lässt sich am ehesten in diese Gruppe zuordnen.

Bindungspartner modulierender Proteine haben eine wichtige Rolle. Sie geben (im sequenziellen Modell) mitunter erste Hinweise auf die Stufe der Wirkung der jeweiligen Proteine. Aus diesem Grund möchte ich auf die bisher bekannten Interaktionen von Snapin eingehen. Da eine direkte Interaktion mit SNAP-25 und hierdurch auch indirekt Synaptotagmin beeinflusst, möchte ich einen funktionellen Vergleich zur Rolle von Synaptotagmin weiter unten aufführen.

Es zeigt sich beim Snapin-*Knockout* eine isolierte Reduktion der *burst*-Komponente. Dies lässt sich am ehesten mit einer reduzierten Größe des fusionskompetenten *pools* erklären. Wie lässt sich der Wirkungsmechanismus von Snapin genauer ergründen?

4.2. Molekularer Mechanismus von Snapin

Ein klassischer Weg den Mechanismus eines Proteins in einem physiologischen Prozess zu identifizieren, ist herauszufinden, mit welchen Faktoren es interagiert. Mithilfe der Genetik können Mutanten gleichen Phänotyps zugeordnet werden. Dies wird besonders gerne in Modellorganismen wie Hefen, *C. elegans* oder *Drosophila* durchgeführt.

Ein alternativer Ansatz zur Identifizierung von Interaktionspartnern ist die Verwendung der biochemischen Analyse. Ein Vorteil hierbei ist, dass die Interaktionspartner auf Proteinebene zugeordnet werden können. Diese Vorgehensweise wird besonders gerne in Säugetiergewebe verwendet, wie auch in dieser Studie.

Für die Interpretation der Rolle von Snapin ist es nun wichtig, einige Ergebnisse meiner Kollegen (im Labor) und unserer Kollaborateure aufzuzeigen. Im Kontext dieser Arbeiten können die genauen Effekte von Snapin eingegrenzt und die Funktion des untersuchten Proteins aufgrund der von mir gewonnenen Daten zugeordnet werden.

4.2.1. Biochemie am Snapin-*Knockout*

Aufgrund der genomischen Manipulation der Chromaffinziellen ist wichtig zu wissen,

ob die aktuell zu untersuchende Nullmutation auf molekularer Ebene zu qualitativen oder quantitativen Veränderungen von am Sekretionsprozess beteiligten Strukturen führt. Hierzu haben meine Kollegen im Labor von Professor Zu-Hang Sheng, *Synaptic Function Unit, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, USA parallel zu meiner Arbeit in biochemischen Essays folgende 3 Beobachtungen gemacht:

1) Es finden sich keine Hinweise auf gestörte Proteinbildungen im Snapin-*Knockout*. Im Immunoblot können keine Veränderungen in den Expressionsleveln von Synaptotagmin-1 und den Strukturproteinen des SNARE-Komplexes im Vergleich zwischen Snapin-Wildtyp und -*Knockout* gesehen werden. Die regulatorischen Proteine Munc-18 und Complexin sowie die für die Disassemblierung des *cis*-SNARE-Komplex mitwirkenden NSF und α -SNAP sind ebenfalls unverändert.

Somit kann gezeigt werden, dass die grundsätzliche Ausbildung dieser Proteine beim Snapin-*Knockout* nicht alteriert ist und Snapin einen direkten – und nicht indirekten über Auslöschung anderer Proteine – Effektorweg hat.

2) Die Ausbildung des SNARE-Komplexes ist beim Snapin-*Knockout* ungestört. Ein essenziell wichtiger Prozess für die Membranfusion ist die Ausbildung des *trans*-SNARE Komplexes aus Synaptobrevin, SNAP-25 und Synaptotagmin. Weil bekannt ist, dass Snapin an SNAP-25 bindet, ist postuliert worden, dass Snapin mit der Ausbildung des *trans*-SNARE-Komplexes interagiert und damit die Fusion beeinflussen könnte. Um diese Hypothese zu testen, haben meine Kollegen die Ausbildung des SNARE-Komplexes *in vitro* mithilfe von Co-Immunopräzipitations-Experimenten getestet: Sie konnten zeigen, dass gleichgroße Präzipitate von Syntaxin-1, SNAP-25, und Synaptobrevin/VAMP-2 bei Behandlung mit einem anti-SNAP-25-Antikörper nachweisbar waren. Die Ausbildung des SNARE-Komplexes ist also nicht behindert.

3) Beim Snapin-*Knockout* findet sich eine reduzierte Assoziation von Synaptotagmin mit SNAP-25.

Eine weitere Hypothese oder putative Funktion war, dass Snapin nicht mit dem SNARE-Komplex selber sondern die Interaktion des SNARE-Komplexes mit dritten Proteinen moduliert. Hier ist das wichtige Kalziumsensorprotein Synaptotagmin zu nennen (Ilardi et al., 1999). Um diese Hypothese zu testen, wurde die Assoziation von Synaptotagmin mit SNAP-25 beim Snapin-Wildtyp mit dem -*Knockout* verglichen:

Durch Co-Immünipräzitation zeigt sich eine verminderte Assoziation von Synaptotagmin mit SNAP-25: sowohl mit einem anti-Synaptotagmin-1-Antikörper als auch mit einem anti-SNAP-25-Antikörper zeigen sich deutlich schwächere Bindungen mit SNAP-25 bzw. Synaptotagmin. Quantitativ betrachtet handelt es sich um eine signifikante Reduktion deren Assoziation um etwa ein Drittel (34%) (Ilardi et al., 1999). Diese Resultate sind indikativ dafür, dass Snapin die Neurosekretion durch seine Interaktion auf der Ebene des Zusammenspiels von Synaptotagmin mit SNAP-25 beeinflusst.

Da Synaptotagmin als „Kalziumsensor“ für die Membranfusion eine zentrale Rolle bei Exozytoseprozessen einnimmt, möchte ich nochmals auf das Kalziumrampen-Experiment eingehen und einen funktionellen Vergleich mit Synaptotagmin ziehen. Wichtig hierbei ist die Frage, ob Snapin einen kalziumabhängigen Schritt (indirekt) beeinflusst.

Das Kalziumrampenexperiment hat mein Kollege Dr. Zheng-Xing Wu in unserem Labor durchgeführt. Hier konnten keine unterschiedlichen Kalziumabhängigkeiten in den unterschiedlichen *pools* bei Wildtyp und Snapin-Mutanten gesehen werden. Somit kann gezeigt werden, dass weder Kalziumsensitivität noch -kooperativität verändert sind. Damit ist eine unmittelbare Einflussnahme von Snapin am späten, direkt kalziumgetriggerten Schritt der Membranfusion ausgeschlossen.

Wenn infolge der Ausschaltung von Snapin die Aktion von Synaptotagmin-1 durch ein weniger stabiles Zusammenspiel zwischen Synaptotagmin und SNAP-25 gestört ist, dann müsste dieser Snapin-*Knockout*-Phänotyp ähnlich sein wie wenn die Funktion von Synaptotagmin-1 selber gestört ist. Im Vergleich zur Snapin-Nullmutante führt die Entfernung von Synaptotagmin-1 aus Chromaffinzellen ebenso zu einer gestörten kalziumabhängigen Fusion mit vollständigem Verlust der Vesikel im RRP („*fast burst*“) (Nagy et al., 2006).

Dennoch zeigt der Snapin-*Knockout* mit Wegfall seiner stabilisierenden Funktion nicht den gleichen Phänotyp: Beim Synaptotagmin-1-*Knockout* ist gegensätzlicherweise auch das *Docking* gestört. Snapin beeinflusst aber nach den von mir und meinen Kollegen erhobenen Daten nur das *Priming*. Deshalb müsste Synaptotagmin-1 auch eine Rolle in einem voran geschalteten Prozess vom reinen letzten Schritt der Membranfusion, also dem Kalziumsensor mit direkter Triggerung der Fusion, haben, zum Beispiel im *Docking-priming*-Schritt. In der Tat haben de Wit et al. zu einem späteren Zeitpunkt auch einen solchen voran geschalteten Schritt gefunden:

Synaptotagmin-1 übt die Funktion des lange gesuchten „*Docking-Proteins*“ in Chromaffinzellen zusammen mit und durch Bindung an Syntaxin und SNAP-25 aus (de Wit et al., 2009). Interaktionen zwischen Snapin und anderen Isoformen der Synaptotagmin-Familie sind bislang nicht bekannt und müssen noch untersucht werden.

In diesem Zusammenhang ist die Rolle der Isoform Synaptotagmin-7 zu erwähnen: Synaptotagmin-7 wurde kürzlich neben Synaptotagmin-1 als Kalziumsensor in Chromaffinzellen beschrieben (Schonn et al., 2008). Beide Proteine vermitteln zusammen – aber unabhängig von einander – fast den kompletten, schnellen, kalziumabhängigen Exozytoseprozess (*burst*-Komponente) in Chromaffinzellen (im Gegensatz zur neuronalen Exocytose). Die Tatsache, dass beim Snapin-*Knockout* nicht die gesamte schnelle, kalziumabhängige Exozytose gestört ist, lässt sich nun vor diesem Hintergrund gut erklären: Snapin bindet an Synaptotagmin-1 und vermindert die Synaptotagmin-1-medierte Exozytose. Da allerdings noch Synaptotagmin-7 als unabhängiger Kalziumsensor in Chromaffinzellen ist, kann hierüber die *burst*-Komponente aus fusionskompetenten Vesikeln erfolgen. Quantitativ betrachtet zeigen Schonn und Kollegen beim Synaptotagmin-7-*Knockout* eine Verminderung des *exocytotic burst* um ca. 50%, sodass im Umkehrschluss Synaptotagmin-7 wohl für etwa 50% des *burst* mitverantwortlich ist. Dies steht in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, da die Synaptotagmin-1-vermittelte Exozytose im Snapin-*Knockout* um 45% reduziert ist und somit die verbliebenen 55% Ausdruck (überwiegend?) Synaptotagmin-7-vermittelter Exozytose (versus ca. 50% bei Schonn et al.) sein können. Wenn es sich in der Tat um eine (überwiegend?) Synaptotagmin-7 vermittelte Exozytose handeln würde, dann wären die Fusionskinetiken von Synaptotagmin-1 und -7 vermutlich ähnlich, da man sonst einen Unterschied in der Anstiegssteilheit des *burst* beim Snapin-*Knockout* gesehen hätte. Die Zeitkonstanten waren allerdings auch nicht signifikant verändert.

Die phänotypische Analyse vom Snapin-*Knockout* hat gezeigt, dass RRP und SRP gleichzeitig beeinflusst sind. Zudem ist die Kalziumsensitivität nicht verändert. Der Effekt von Snapin ist demnach an einem voran geschalteten Schritt.

Die biochemische Analyse zeigt, dass die Interaktion von SNAP-25/Syntaxin mit Synaptotagmin gestört ist. Da die Kalziumsensitivität (Rampenexperiment) nicht verändert ist, handelt es sich um einen Synaptotagmin-Effekt, der nicht Kalzium abhängig ist (also nicht Membranfusion). Im Synaptotagmin-*Knockout* sieht man

einen *Docking*-Defekt.

Zusammen genommen heißt das, dass die Modulation von Snapin ein Effekt in einem dem Kalziumtriggern vorgeschalteten Prozess, also im *Docking-priming*-Bereich ist.

4.2.2. Morphologische Untersuchungen am *Knockout*

Nach den Vergleichen mit anderen modulierenden Proteinen und den biochemischen Ergebnissen ist zum genaueren Verständnis, in welchem Schritt Snapin nun wirkt, eine dezidierte Betrachtung des *Primings* und des *Dockings* notwendig.

Somit waren parallel zu meinen funktionellen Experimenten andere Untersuchungen notwendig, die zwischen den einzelnen Schritten des *Dockings* und des *Primings* zu unterscheiden vermochten. Meine Kollegen in der *Electron Microscopy Facility* (Professor Zu-Hang Sheng, *National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*) führten hierzu elektronenmikroskopische Untersuchungen an Chromaffinzellen des Snapin-Wildtyp und -*Knockout* aus. Durch Abstandsmessung kann im statistischen Vergleich zwischen Nullmutante und Wildtyp kein Unterschied im *Docking* detektiert werden.

Somit kann der Rückschluss gezogen werden, dass weder die Ausbildung von LDCV noch das *Docking* an die Plasmamembran gestört sind. Infolgedessen und aufgrund des sequenziellen Charakters exozytotischer Prozesse können die beobachteten funktionellen Effekte auf einen Schritt *nach* dem *Docking* eingeschränkt werden.

Daneben konnten auch elektronenmikroskopische Untersuchungen hippokampaler Synapsen eine normale räumliche Anordnung bekannter Strukturen sichern. Dies steht dahingehend mit den Ergebnissen meiner Rescue-Experimente in Einklang, dass im Falle morphologisch gestörter Formation des exozytotischen Apparats durch Abwesenheit von Snapin auch kein funktioneller Rescue möglich gewesen wäre. Somit unterstreichen diese methodologisch unterschiedlichen – aber den selben Effekt beleuchtenden – Herangehensweisen noch einmal die Spezifität der aufgeführten Prozesse und Effekte.

4.3. Zusammenfassende Einordnung zur vorgeschlagenen Rolle von Snapin

Wo findet sich aber nun die Rolle von Snapin?

Dass Snapin eine wichtige Rolle am Prozess der Exozytose spielt verdeutlicht ein perinatal letaler Phänotyp nach genomischer Depletion des Proteins ausreichend gut.

Die ausführliche Analyse hat die wesentlichen 3 Fakten zu Tage gebracht:

- 1) Die Biochemie zeigt, dass Snapin die Interaktion von SNAP-25 und Synaptotagmin reguliert.
- 2) Die funktionelle Analyse zeigt, dass der fusionskompetente *pool* beim Verlust von Snapin reduziert ist, ohne dass der schnellere Pool (RRP) präferenziell beeinträchtigt wäre. Daneben haben die Kalziumrampen-Experimente beim Snapin-*Knockout* gezeigt, dass die Kalziumsensitivität unbeeinflusst ist. Dies führt zu dem Schluss, dass Snapin nicht die klassische Funktion von Synaptotagmin, nämlich das Triggern des schnellen, fusionskompetenten Pools, (direkt oder indirekt) beeinflusst.

Weiterhin zeigt sich über die Tatsache, dass die verzögerte Freisetzungskomponente von der Abwesenheit von Snapin unberührt bleibt, dass Vesikel in fusionskompetente Pools überführt werden können. Somit ist die Einflussnahme von Snapin keinem „vorwärts“ gerichteten sondern einem „rückwärts“ gerichteten Effekt bei der Neurosekretion zuzuschreiben.

- 3) Die morphologische Analyse zeigt keinen ausgeprägten *Docking*-Defekt.

Diese Daten zusammengefasst führen zu der Konklusion, dass die Synaptotagmin-SNAP-25-Interaktion im *Priming* von Vesikeln von Bedeutung ist und dass diese Funktion von Snapin moduliert wird.

Eine Eingliederung in das bestehende Modell über die sequenziellen Abläufe der regulierten Exozytose lässt sich damit folgendermaßen vorschlagen: Snapin ändert als Regulator durch Stabilisierung der Interaktion zwischen dem Kalziumsensor „Synaptotagmin“ und dem Effektor „SNARE-Komplex“ das Gleichgewicht zwischen fusionskompetenten Vesikeln und Vesikeln im nicht zur Fusion vorbereitetem Pool.

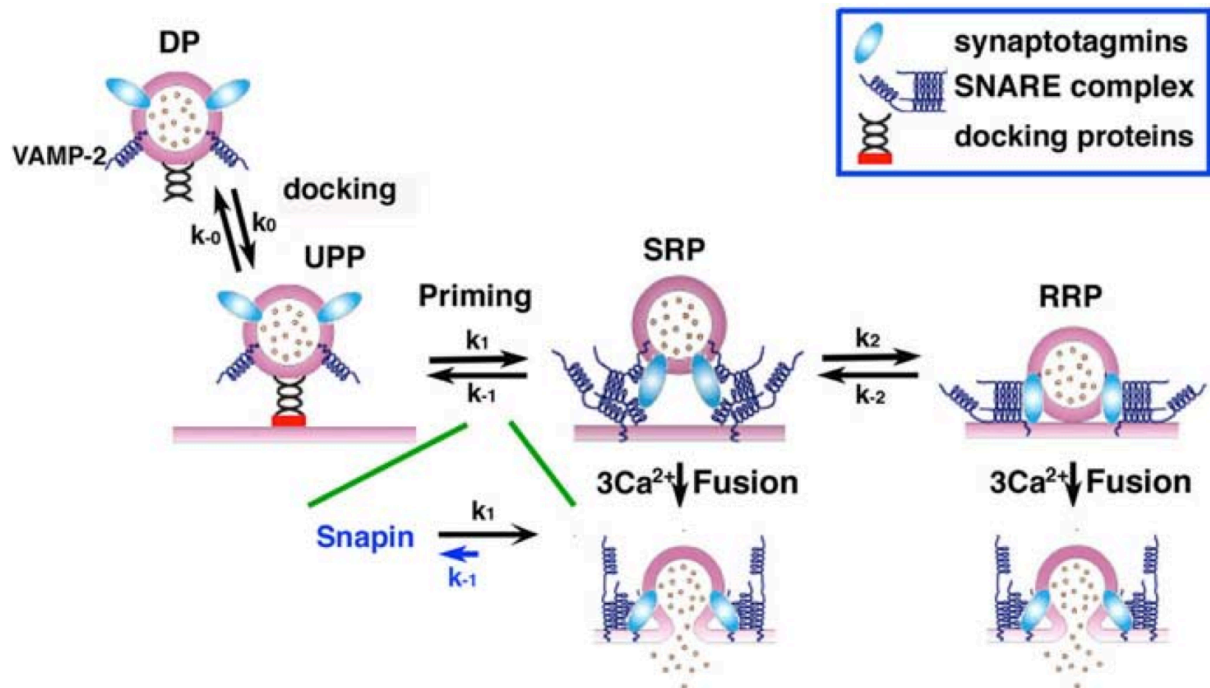


Abb. 23: Modell zur vorgeschlagenen Rolle von Snapin bei der Vesikelreifung und am Reifungsprozess.

Abgebildet sind die sequenziellen Schritte der Vesikelreifung bis zum Fusionsprozess im kinetischen Modell zur gerichteten Exozytose bei Chromaffinzellen.

Nach dem *Docking* unterlaufen LDCV einen ATP-abhängigen Reifungsschritt, das *Priming*, bevor sie in jeweils kalziumabhängigen Schritten mit der Plasmamembran fusionieren und somit ihre sekretorische Funktion ausüben können.

Durch Bindung an SNAP-25 verstärkt Snapin die Assoziation des SNARE-Komplex mit Synaptotagmin. Hierdurch wird die rückwärts gerichtete Gleichgewichtskonstante zwischen dem fusionskompetenten Pool (RRP + SRP) und dem *nicht* fusionskompetenten Pool (UPP) in ihrer Wirkung vermindert. Dies bedeutet eine Stabilisierung von freisetzungsbereiten Vesikeln im RRP und SRP. (Tian et al., 2005)

4.4. Ausblick

Als Regulator der kalziumabhängigen Neuroexozytose nimmt Snapin durch Beeinflussung eines Schritts im *Priming*-Prozess dahingehend eine interessante Position ein als dass hier die strukturelle und funktionelle Kopplung des Kalziumsensors Synaptotagmin mit dem SNARE-Komplex beeinflusst wird.

Direkt aus diesen Daten ergeben sich Fragen, die z.T. schon in der aktuellen Literatur schon beantwortet werden können.

Eine Studie von Pan und Kollegen zeigte an Neuronen einen Ansatz wie die aufgeworfene Frage der „*mechanischen*“ Regulation der Interaktion von Synaptotagmin mit dem SNARE-Komplex zu beantworten ist: In biochemischen und funktionellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in den ersten Stufen des *primings* die strukturelle Kopplung von Synaptotagmin-1 und SNAREs unabhängig von Kalzium erfolgt, allerdings von einem Snapin-Dimer stabilisiert werden konnte. Dimerisationsbehinderte Mutanten behindern das *Priming*. Die Dimerisation Snapins spielt demnach vermutlich eine Rolle beim Greifen von SNAREs zusammen mit Synaptotagmin-1 vor dem Kalziumsignal. Hierdurch können Vesikel im fusionskompetenten Pool stabilisiert werden (Pan et al., 2009).

In Chromaffinzellen konnte eine andere Beobachtung gemacht werden: Die Frage nach dem Einfluss von Snapin auf Freisetzungsraten wurde in Überexpressionsexperimenten weiter untersucht. Darin zeigte sich, dass durch Snapin-Überexpression eine gesteigerte Exozytosekapazität aus dem fusionskompetenten Pool resultiert. Durch Snapin kann demnach die schnelle Freisetzungskomponente bei *niedrigeren* intrazellulären Kalziumkonzentrationen erzielt werden (Schmidt et al., 2013). Dies passt gut – auch modellübergreifend – zu dem in Neuronen beobachteten Phänomen, das spontane Freisetzung (mEPSC-Frequenz) bei einer nicht funktionellen Snapin-Mutation vermindert ist (Pan et al., 2009). Ursächlich anzunehmen wäre dabei eine erhöhte Schwelle für Vesikel zur Fusion in (funktioneller) Abwesenheit von Snapin, der durch den von Pan und Kollegen beschriebenen Effekt von Snapin – das Greifen von SNAREs zusammen mit Synaptotagmin-1 – erklärt werden könnte.

Aber auch diskrepante Ergebnisse zu meinen sind mittlerweile veröffentlicht worden: hier wäre z.B. ein *docking*-Defekt bei einer Snapin-Nullmutation in *C. elegans* zu nennen (Yu et al., 2013) bei ansonsten gleichen Effekten (SNARE-Komplex-

Stabilisierung vor Kalziumtriggering). Am ehesten lässt sich dieser Unterschied auf das unterschiedliche Modell – in *C. elegans* im Vergleich zu Messungen an Säugetierzellen – erklären.

Weitere Rollen für unterschiedliche Aufgaben im Zusammenspiel von Membranen wurden für Snapin identifiziert: Snapin koordiniert in Neuronen den axonal retrograden Transport und endosomal-lysosomalen Umsatz, was für die autophagozytotisch-lysosomale Funktion wichtig ist (Cai et al., 2010). Aus entwicklungsphysiologischer Perspektive wird eine gestörte Funktion in funktionellen Netzwerken mit einer verminderten Variabilität bei Neuronen und Neurodegeneration in Zusammenhang gebracht (Cai and Sheng, 2011). Im Mausmodell können hierüber Bezüge zur Schizophrenie gezogen werden (Feng et al., 2008), im Grundsatz wird aber auch eine Störung der autophagozytotisch-lysosomalen Funktion mit der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht wie die Alzheimer- und Parkinson-Erkrankung oder die Chorea Huntington.

Dies zusammengefasst unterstreicht die außerordentlich interessante Position von Snapin zwischen anderen Regulatoren und Effektoren des Vesikeltransports. Weitere Untersuchungen zur Rolle von Snapin in der synaptischen Transmission und auch zur Rolle in ganzen Netzwerken werden zum Verständnis dieser sehr komplexen Vorgänge beitragen.

5. Zusammenfassung

Snapin ist ein kürzlich entdecktes Protein, das in Neuronen und neurosekretorischen Zellen vorkommt und an SNAP-25, einem Protein der Exozytosemaschinerie, bindet. Erste biochemische und funktionelle Untersuchungen deuteten auf eine modulatorische Rolle von Snapin am Exozytoseprozess hin, ohne dass ein genauer molekularer Wirkmechanismus beschrieben werden konnte.

In Experimenten mit Blitzlichtphotolyse von gebundenem Kalzium, die über eine millisekunden genaue Steuerung eine genaue Kontrolle der hier untersuchten Kalzium regulierten Prozesse erlaubt, kann eine um ca. 45% deutlich verminderte Fähigkeit zur schnellen Exozytose gesehen werden. Detektion von ausgeschleusten Katecholaminen kann einen Beladungsdefekt der Vesikel zudem ausschließen. Wiedereinführung des Snapin-Wildtyp-Gens durch Transfektion kann den funktionellen Defekt an Zellen in Kultur wieder rückgängig machen.

Einen direkt Kalzium abhängigen Effekt konnten wir ausschließen. Morphologisch ließ sich ein *docking*-Defekt von Vesikeln elektronenmikroskopisch nicht nachweisen. Weiterhin konnten biochemische Essays zeigen, dass die Unterbrechung der Bindung von Snapin an SNAP25 im Snapin-*Knockout* eine verminderte Assoziation des SNARE-Komplex zu Synaptotagmin, dem Kalziumsensor und Exozytosetrigger, nach sich zieht. Aus der molekularen, mechanischen Perspektive führt dies zu einer Destabilisierung der Überführungsreaktion von Vesikeln in den fusionskompetenten Pool mit konsekutiver Verminderung der Exozytosekapazität.

Zusammengenommen bedeutet dies, dass Snapin während des *primings* durch Stabilisierung des SNAP-25/SNARE-Komplexes dessen Assoziation zu Synaptotagmin stabilisiert und hierüber Vesikel im fusionsbereiten Pool bereitzustellen hilft.

6. Literaturverzeichnis

- Arac, D., Chen, X., Khant, H.A., Ubach, J., Ludtke, S.J., Kikkawa, M., Johnson, A.E., Chiu, W., Sudhof, T.C., and Rizo, J. (2006). Close membrane-membrane proximity induced by Ca(2+)-dependent multivalent binding of synaptotagmin-1 to phospholipids. *Nature structural & molecular biology* 13, 209-217.
- Ashery, U., Betz, A., Xu, T., Brose, N., and Rettig, J. (1999). An efficient method for infection of adrenal chromaffin cells using the Semliki Forest virus gene expression system. *European journal of cell biology* 78, 525-532.
- Ashery, U., Varoqueaux, F., Voets, T., Betz, A., Thakur, P., Koch, H., Neher, E., Brose, N., and Rettig, J. (2000). Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *The EMBO journal* 19, 3586-3596.
- Augustin, I., Rosenmund, C., Sudhof, T.C., and Brose, N. (1999). Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400, 457-461.
- Basu, J., Shen, N., Dulubova, I., Lu, J., Guan, R., Guryev, O., Grishin, N.V., Rosenmund, C., and Rizo, J. (2005). A minimal domain responsible for Munc13 activity. *Nature structural & molecular biology* 12, 1017-1018.
- Becherer, U., Moser, T., Stuhmer, W., and Oheim, M. (2003). Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nature neuroscience* 6, 846-853.
- Betz, A., Okamoto, M., Benseler, F., and Brose, N. (1997). Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *The Journal of biological chemistry* 272, 2520-2526.
- Borisovska, M., Zhao, Y., Tsytsyura, Y., Glyvuk, N., Takamori, S., Matti, U., Rettig, J., Sudhof, T., and Bruns, D. (2005). v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *The EMBO journal* 24, 2114-2126.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Bruns, D. (2004). Detection of transmitter release with carbon fiber electrodes. *Methods (San Diego, Calif)* 33, 312-321.
- Burgess, T.L., and Kelly, R.B. (1987). Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annual review of cell biology* 3, 243-293.
- Cai, Q., Lu, L., Tian, J.H., Zhu, Y.B., Qiao, H., and Sheng, Z.H. (2010). Snapin-regulated late endosomal transport is critical for efficient autophagy-lysosomal function in neurons. *Neuron* 68, 73-86.
- Cai, Q., and Sheng, Z.H. (2011). Uncovering the role of Snapin in regulating autophagy-lysosomal function. *Autophagy* 7, 445-447.
- Chen, Y.A., and Scheller, R.H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 98-106.

- Chheda, M.G., Ashery, U., Thakur, P., Rettig, J., and Sheng, Z.H. (2001). Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. *Nature cell biology* 3, 331-338.
- Chow, R.H., von Ruden, L., and Neher, E. (1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* 356, 60-63.
- de Wit, H., Cornelisse, L.N., Toonen, R.F., and Verhage, M. (2006). Docking of secretory vesicles is syntaxin dependent. *PloS one* 1, e126.
- de Wit, H., Walter, A.M., Milosevic, I., Gulyas-Kovacs, A., Riedel, D., Sorensen, J.B., and Verhage, M. (2009). Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. *Cell* 138, 935-946.
- Deak, F., Xu, Y., Chang, W.P., Dulubova, I., Khvotchev, M., Liu, X., Sudhof, T.C., and Rizo, J. (2009). Munc18-1 binding to the neuronal SNARE complex controls synaptic vesicle priming. *The Journal of cell biology* 184, 751-764.
- Diao, J., Su, Z., Lu, X., Yoon, T.Y., Shin, Y.K., and Ha, T. (2010). Single-Vesicle Fusion Assay Reveals Munc18-1 Binding to the SNARE Core Is Sufficient for Stimulating Membrane Fusion. *ACS chemical neuroscience* 1, 168-174.
- DiCiommo, D.P., and Bremner, R. (1998). Rapid, high level protein production using DNA-based Semliki Forest virus vectors. *The Journal of biological chemistry* 273, 18060-18066.
- Dolensek, J., Skelin, M., and Rupnik, M.S. (2011). Calcium dependencies of regulated exocytosis in different endocrine cells. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 60 Suppl 1, S29-38.
- Dulubova, I., Lou, X., Lu, J., Huryeva, I., Alam, A., Schneggenburger, R., Sudhof, T.C., and Rizo, J. (2005). A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *The EMBO journal* 24, 2839-2850.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Sudhof, T.C., and Rizo, J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *The EMBO journal* 18, 4372-4382.
- Eliasson, L., Ma, X., Renstrom, E., Barg, S., Berggren, P.O., Galvanovskis, J., Gromada, J., Jing, X., Lundquist, I., Salehi, A., *et al.* (2003). SUR1 regulates PKA-independent cAMP-induced granule priming in mouse pancreatic B-cells. *The Journal of general physiology* 121, 181-197.
- Ellis-Davies, G.C., and Kaplan, J.H. (1994). Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator that selectively binds Ca²⁺ with high affinity and releases it rapidly upon photolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 187-191.
- Ellis-Davies, G.C., Kaplan, J.H., and Barsotti, R.J. (1996). Laser photolysis of caged calcium: rates of calcium release by nitrophenyl-EGTA and DM-nitrophen. *Biophysical journal* 70, 1006-1016.

Fasshauer, D., Otto, H., Eliason, W.K., Jahn, R., and Brunger, A.T. (1997). Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *The Journal of biological chemistry* 272, 28036-28041.

Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T., and Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15781-15786.

Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachee-Chardin, M., Chedeville, G., Tamary, H., *et al.* (2003). Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 115, 461-473.

Feng, Y.Q., Zhou, Z.Y., He, X., Wang, H., Guo, X.L., Hao, C.J., Guo, Y., Zhen, X.C., and Li, W. (2008). Dysbindin deficiency in sandy mice causes reduction of snapin and displays behaviors related to schizophrenia. *Schizophrenia research* 106, 218-228.

Fenwick, E.M., Marty, A., and Neher, E. (1982). A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *The Journal of physiology* 331, 577-597.

Futai, K., Okada, M., Matsuyama, K., and Takahashi, T. (2001). High-fidelity transmission acquired via a developmental decrease in NMDA receptor expression at an auditory synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 3342-3349.

Gonon, F., Bao, J.X., Msghina, M., Suaud-Chagny, M.F., and Stjarne, L. (1993). Fast and local electrochemical monitoring of noradrenaline release from sympathetic terminals in isolated rat tail artery. *Journal of neurochemistry* 60, 1251-1257.

Gonzalez-Velez, V., Dupont, G., Gil, A., Gonzalez, A., and Quesada, I. (2012). Model for glucagon secretion by pancreatic alpha-cells. *PloS one* 7, e32282.

Grishanin, R.N., Kowalchyk, J.A., Klenchin, V.A., Ann, K., Earles, C.A., Chapman, E.R., Gerona, R.R., and Martin, T.F. (2004). CAPS acts at a prefusion step in dense-core vesicle exocytosis as a PIP2 binding protein. *Neuron* 43, 551-562.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* 260, 3440-3450.

Gulyas-Kovacs, A., de Wit, H., Milosevic, I., Kochubey, O., Toonen, R., Klingauf, J., Verhage, M., and Sorensen, J.B. (2007). Munc18-1: sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 8676-8686.

Gumbiner, B., and Kelly, R.B. (1982). Two distinct intracellular pathways transport secretory and membrane glycoproteins to the surface of pituitary tumor cells. *Cell* 28, 51-59.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 391, 85-100.

Hammarlund, M., Watanabe, S., Schuske, K., and Jorgensen, E.M. (2008). CAPS and syntaxin dock dense core vesicles to the plasma membrane in neurons. *The Journal of cell biology* 180, 483-491.

Hanson, P.I., Heuser, J.E., and Jahn, R. (1997). Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Current opinion in neurobiology* 7, 310-315.

Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Sudhof, T.C., and Niemann, H. (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *The EMBO journal* 13, 5051-5061.

He, L., Xue, L., Xu, J., McNeil, B.D., Bai, L., Melicoff, E., Adachi, R., and Wu, L.G. (2009). Compound vesicle fusion increases quantal size and potentiates synaptic transmission. *Nature* 459, 93-97.

Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E., and Matthews, G. (1994). Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 371, 513-515.

Heinemann, C., von Ruden, L., Chow, R.H., and Neher, E. (1993). A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 424, 105-112.

Ilardi, J.M., Mochida, S., and Sheng, Z.H. (1999). Snapin: a SNARE-associated protein implicated in synaptic transmission. *Nature neuroscience* 2, 119-124.

Jahn, R., Lang, T., and Sudhof, T.C. (2003). Membrane fusion. *Cell* 112, 519-533.

Jahn, R., and Niemann, H. (1994). Molecular mechanisms of clostridial neurotoxins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 733, 245-255.

Jahn, R., and Scheller, R.H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 631-643.

Jaiswal, J.K., Andrews, N.W., and Simon, S.M. (2002). Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *The Journal of cell biology* 159, 625-635.

James, D.J., Kowalchuk, J., Daily, N., Petrie, M., and Martin, T.F. (2009). CAPS drives trans-SNARE complex formation and membrane fusion through syntaxin interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 17308-17313.

Jockusch, W.J., Speidel, D., Sigler, A., Sorensen, J.B., Varoqueaux, F., Rhee, J.S., and Brose, N. (2007). CAPS-1 and CAPS-2 are essential synaptic vesicle priming proteins. *Cell* 131, 796-808.

Kasai, H., Takahashi, N., and Tokumaru, H. (2012). Distinct initial SNARE configurations underlying the diversity of exocytosis. *Physiological reviews* 92, 1915-1964.

Leszczyszyn, D.J., Jankowski, J.A., Viveros, O.H., Diliberto, E.J., Jr., Near, J.A., and Wightman, R.M. (1991). Secretion of catecholamines from individual adrenal medullary chromaffin cells. *Journal of neurochemistry* 56, 1855-1863.

Liljestrom, P., and Garoff, H. (1991). A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Bio/technology* (Nature Publishing Company) 9, 1356-1361.

Liljestrom, P., and Garoff, H. (2001). Expression of proteins using Semliki Forest virus vectors. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M Ausubel [et al] *Chapter 16*, Unit16.20.

Lindau, M. (1991). Time-resolved capacitance measurements: monitoring exocytosis in single cells. *Quarterly reviews of biophysics* 24, 75-101.

Lindau, M., and Neher, E. (1988). Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 411, 137-146.

Liu, Y., Schirra, C., Edelmann, L., Matti, U., Rhee, J., Hof, D., Bruns, D., Brose, N., Rieger, H., Stevens, D.R., *et al.* (2010). Two distinct secretory vesicle-priming steps in adrenal chromaffin cells. *The Journal of cell biology* 190, 1067-1077.

Liu, Y., Schirra, C., Stevens, D.R., Matti, U., Speidel, D., Hof, D., Bruns, D., Brose, N., and Rettig, J. (2008). CAPS facilitates filling of the rapidly releasable pool of large dense-core vesicles. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 5594-5601.

Mansvelder, H.D., and Kits, K.S. (2000). Calcium channels and the release of large dense core vesicles from neuroendocrine cells: spatial organization and functional coupling. *Progress in neurobiology* 62, 427-441.

Martens, S., Kozlov, M.M., and McMahon, H.T. (2007). How synaptotagmin promotes membrane fusion. *Science (New York, NY)* 316, 1205-1208.

Martinez, I., Chakrabarti, S., Hellevik, T., Morehead, J., Fowler, K., and Andrews, N.W. (2000). Synaptotagmin VII regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *The Journal of cell biology* 148, 1141-1149.

Marty, A., and Neher, E. (1995). Tight-seal whole-cell recording. In *Single channel recording* (New York: Plenum Press), pp. 31-52.

Morgan, A., and Burgoyne, R.D. (1997). Common mechanisms for regulated exocytosis in the chromaffin cell and the synapse. *Seminars in cell & developmental biology* 8, 141-149.

Mullock, B.M., Bright, N.A., Fearon, C.W., Gray, S.R., and Luzio, J.P. (1998). Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *The Journal of cell biology* 140, 591-601.

Nagy, G., Kim, J.H., Pang, Z.P., Matti, U., Rettig, J., Sudhof, T.C., and Sorensen, J.B. (2006). Different effects on fast exocytosis induced by synaptotagmin 1 and 2 isoforms and

abundance but not by phosphorylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 632-643.

Nagy, G., Reim, K., Matti, U., Brose, N., Binz, T., Rettig, J., Neher, E., and Sorensen, J.B. (2004). Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron* 41, 417-429.

Naraghi, M., Muller, T.H., and Neher, E. (1998). Two-dimensional determination of the cellular Ca²⁺ binding in bovine chromaffin cells. *Biophysical journal* 75, 1635-1647.

Neher, E. (1992a). Ion channels for communication between and within cells. *Science (New York, NY)* 256, 498-502.

Neher, E. (1992b). Nobel lecture. Ion channels for communication between and within cells. *Neuron* 8, 605-612.

Neher, E. (1998). Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20, 389-399.

Neher, E. (2006). A comparison between exocytic control mechanisms in adrenal chromaffin cells and a glutamatergic synapse. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 453, 261-268.

Neher, E., and Marty, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 6712-6716.

Niemann, H., Blasi, J., and Jahn, R. (1994). Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends in cell biology* 4, 179-185.

Nofal, S., Becherer, U., Hof, D., Matti, U., and Rettig, J. (2007). Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 1386-1395.

Pan, P.Y., Tian, J.H., and Sheng, Z.H. (2009). Snapin facilitates the synchronization of synaptic vesicle fusion. *Neuron* 61, 412-424.

Plattner, H., Artalejo, A.R., and Neher, E. (1997). Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *The Journal of cell biology* 139, 1709-1717.

Rao, S.K., Huynh, C., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., and Andrews, N.W. (2004). Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *The Journal of biological chemistry* 279, 20471-20479.

Rettig, J., and Neher, E. (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis. *Science (New York, NY)* 298, 781-785.

Rosenmund, C., Sigler, A., Augustin, I., Reim, K., Brose, N., and Rhee, J.S. (2002). Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms. *Neuron* 33, 411-424.

- Rosenmund, C., and Stevens, C.F. (1996). Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 16, 1197-1207.
- Sadakata, T., Washida, M., and Furuichi, T. (2007). Alternative splicing variations in mouse CAPS2: differential expression and functional properties of splicing variants. *BMC neuroscience* 8, 25.
- Sakmann, B., and Neher, E. (1995). *Single channel recording* (New York Plenum Press).
- Schmidt, T., Schirra, C., Matti, U., Stevens, D.R., and Rettig, J. (2013). Snapin accelerates exocytosis at low intracellular calcium concentration in mouse chromaffin cells. *Cell calcium* 54, 105-110.
- Schneggenburger, R., and Neher, E. (2000). Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature* 406, 889-893.
- Schoch, S., Deak, F., Konigstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Sudhof, T.C., and Kavalali, E.T. (2001). SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science* (New York, NY) 294, 1117-1122.
- Schonn, J.S., Maximov, A., Lao, Y., Sudhof, T.C., and Sorensen, J.B. (2008). Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping Ca^{2+} sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3998-4003.
- Schroeder, T.J., Jankowski, J.A., Kawagoe, K.T., Wightman, R.M., Lefrou, C., and Amatore, C. (1992). Analysis of diffusional broadening of vesicular packets of catecholamines released from biological cells during exocytosis. *Analytical chemistry* 64, 3077-3083.
- Shin, Y. (2008). Large Dense Core Vesicle Exocytosis in Mouse Chromaffin Cells is Regulated by Munc13s and Baiap3, Georg-August-Universität, ed. (Göttingen).
- Simpson, A.W. (1999). Fluorescent measurement of $[Ca^{2+}]_c$. Basic practical considerations. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 114, 3-30.
- Smith, C., and Neher, E. (1997). Multiple forms of endocytosis in bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of cell biology* 139, 885-894.
- Sollner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H., and Rothman, J.E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75, 409-418.
- Sorensen, J.B., Matti, U., Wei, S.H., Nehring, R.B., Voets, T., Ashery, U., Binz, T., Neher, E., and Rettig, J. (2002). The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1627-1632.
- Sorensen, J.B., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R.B., Brose, N., Wilson, M.C., and Neher, E. (2003). Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* 114, 75-86.
- Sorensen, J.B., Wiederhold, K., Muller, E.M., Milosevic, I., Nagy, G., de Groot, B.L., Grubmuller, H., and Fasshauer, D. (2006). Sequential N- to C-terminal SNARE complex

assembly drives priming and fusion of secretory vesicles. *The EMBO journal* 25, 955-966.

Speidel, D., Bruederle, C.E., Enk, C., Voets, T., Varoqueaux, F., Reim, K., Becherer, U., Fornai, F., Ruggieri, S., Holighaus, Y., *et al.* (2005). CAPS1 regulates catecholamine loading of large dense-core vesicles. *Neuron* 46, 75-88.

Stevens, D.R., and Rettig, J. (2009). The Ca(2+)-dependent activator protein for secretion CAPS: do I dock or do I prime? *Molecular neurobiology* 39, 62-72.

Stevens, D.R., Schirra, C., Becherer, U., and Rettig, J. (2011). Vesicle pools: lessons from adrenal chromaffin cells. *Frontiers in synaptic neuroscience* 3, 2.

Stevens, D.R., Wu, Z.X., Matti, U., Junge, H.J., Schirra, C., Becherer, U., Wojcik, S.M., Brose, N., and Rettig, J. (2005). Identification of the minimal protein domain required for priming activity of Munc13-1. *Current biology : CB* 15, 2243-2248.

Sudhof, T.C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375, 645-653.

Sudhof, T.C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annual review of neuroscience* 27, 509-547.

Sudhof, T.C. (2013a). A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nature medicine* 19, 1227-1231.

Sudhof, T.C. (2013b). Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* 80, 675-690.

Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353.

Thakur, P., Stevens, D.R., Sheng, Z.H., and Rettig, J. (2004). Effects of PKA-mediated phosphorylation of Snapin on synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 6476-6481.

Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.

Tian, J.H., Wu, Z.X., Unzicker, M., Lu, L., Cai, Q., Li, C., Schirra, C., Matti, U., Stevens, D., Deng, C., *et al.* (2005). The role of Snapin in neurosecretion: snapin knock-out mice exhibit impaired calcium-dependent exocytosis of large dense-core vesicles in chromaffin cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 10546-10555.

Toonen, R.F., de Vries, K.J., Zalm, R., Sudhof, T.C., and Verhage, M. (2005). Munc18-1 stabilizes syntaxin 1, but is not essential for syntaxin 1 targeting and SNARE complex formation. *Journal of neurochemistry* 93, 1393-1400.

Toonen, R.F., and Verhage, M. (2003). Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. *Trends in cell biology* 13, 177-186.

- Varoqueaux, F., Sigler, A., Rhee, J.S., Brose, N., Enk, C., Reim, K., and Rosenmund, C. (2002). Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9037-9042.
- Verhage, M., Maia, A.S., Plomp, J.J., Brussaard, A.B., Heeroma, J.H., Vermeer, H., Toonen, R.F., Hammer, R.E., van den Berg, T.K., Missler, M., *et al.* (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science (New York, NY)* 287, 864-869.
- Verhage, M., and Sorensen, J.B. (2008). Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 9, 1414-1424.
- Voets, T. (2000). Dissection of three Ca^{2+} -dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 28, 537-545.
- Voets, T., Neher, E., and Moser, T. (1999). Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 23, 607-615.
- von Ruden, L., and Neher, E. (1993). A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science (New York, NY)* 262, 1061-1065.
- Washbourne, P., Thompson, P.M., Carta, M., Costa, E.T., Mathews, J.R., Lopez-Bendito, G., Molnar, Z., Becher, M.W., Valenzuela, C.F., Partridge, L.D., *et al.* (2002). Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nature neuroscience* 5, 19-26.
- Wei, S., Xu, T., Ashery, U., Kollewe, A., Matti, U., Antonin, W., Rettig, J., and Neher, E. (2000). Exocytotic mechanism studied by truncated and zero layer mutants of the C-terminus of SNAP-25. *The EMBO journal* 19, 1279-1289.
- Wu, M.M., Llobet, A., and Lagnado, L. (2009). Loose coupling between calcium channels and sites of exocytosis in chromaffin cells. *The Journal of physiology* 587, 5377-5391.
- Yu, S.C., Klosterman, S.M., Martin, A.A., Gracheva, E.O., and Richmond, J.E. (2013). Differential roles for snapin and synaptotagmin in the synaptic vesicle cycle. *PloS one* 8, e57842.
- Zhou, Z., and Neher, E. (1993). Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of physiology* 469, 245-273.

7. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während der Zeit der Umsetzung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle bedanke ich mich hierzu bei Herrn Professor Dr. Jens Rettig, der mir nicht nur dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt hat, sondern auch jederzeit für Diskussionen und Hilfe bereit stand. Unter seiner Leitung habe ich erste Schritte in wissenschaftlichem Arbeiten gelernt.

Dr. David Stevens danke ich für die konsequente und enge Betreuung mit seiner Unterstützung vom ersten bis zum letzten Tag. Seine ständige Hilfsbereitschaft beginnend mit den elektrophysiologischen Experimenten bis hin zur Fertigstellung des Manuskripts empfinde ich als außergewöhnlich.

Dr. Claudia Schirra, PD Dr. Ute Becherer, Dr. Detlef Hof und Dr. Ulf Matti danke ich für Ihre Hilfe bei molekularbiologischen Fragen und auch bei der Datenanalyse.

Dr. Zheng-Xing Wu und Dr. Cathrin Bruederle danke für alle kleinen Hilfen im Alltag und dass ich auch alle noch so banalen Fragen weitere Male stellen durfte.

Bernadette Schwarz danke ich für alle organisatorische Hilfestellung in und um das Labor und Reiko Trautmann, Manuela Schneider, Katrin Sandmeier und Carolin Brinck danke ich für ihre technische Assistenz.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie. Durch bedingungslose Unterstützung haben sie mir mit ihrer Motivation, ihrem Trost, ihrer Beständigkeit – und besonders: ihrer Geduld – den Rückhalt für diese Arbeit gegeben.

Das Arbeiten in “unserem” Labor an sich wie auch das Umfeld waren für mich eine wesentliche Bereicherung und prägen mein Leben anhaltend.

8. Publikation

Tian J.H., Wu Z.X., Unzicker M., Lu L., Cai Q., Li C., Schirra C., Matti U., Stevens D., Deng C., Rettig J., Sheng Z.H. (2005). The role of Snapin in neurosecretion: snapin knock-out mice exhibit impaired calcium-dependent exocytosis of large dense-core vesicles in chromaffin cells. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 25, 10546-10555